



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular



# DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CURITIBA

2011

**ANA LAURA GRAZZIOTIN**

**HEMOPLASMAS (MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS): PREVALÊNCIA/FREQUÊNCIA DA  
INFECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FILOGENIA DE HEMOPLASMAS EM  
CERVÍDEOS DE CATIVEIRO E VIDA LIVRE DO BRASIL.**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Área de Concentração em Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.**

**Orientador: Prof. Dr. Alexander Welker Biondo**

**CURITIBA**

**2011**

**Mestranda bolsista (Fundação Araucária): Ana Laura Grazziotin  
Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular  
Período de Março de 2009 a Março de 2011  
Departamento de Biologia Celular e Molecular  
Setor de Ciências Biológicas  
Universidade Federal do Paraná**

**Orientador: Profº. Dr. Alexander Welker Biondo**

**Projeto aprovado pela Divisão de Áreas Protegidas da Usina Hidrelétrica Itaipu  
Binacional**

**Nº de Registro no IBAMA: 22158-1 de 12/11/2009**

**Nº. de Registro no Comitê de Ética de Experimentação em Animais (CEEAA): 32/2009**

**CURITIBA**

**2011**

Grazziotin, Ana Laura

Hemoplasmas (Mycoplasmas hemotrópicos): Prevalência/Frequência, caracterização molecular e filogenia em cervídeos de cativeiro e vida livre do Brasil / Ana Laura Grazziotin. – Curitiba, 2011.

137 f. : il.

Orientador: Alexander Welker Biondo

Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011.

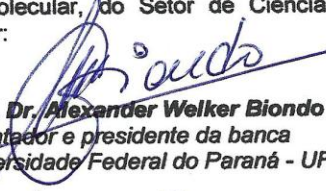
1. Hemoplasmas – Brasil. 2. Biologia Molecular. 3. Animais silvestres. I. Alexander Welker Biondo II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. III. Título.

# PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia  
Setor de Ciências Biológicas  
Universidade Federal do Paraná  
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

## PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

  
**Prof. Dr. Alexander Welker Biondo**  
Orientador e presidente da banca  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

  
**Prof. Dr. Ivan Roque de Barros Filho**  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

  
**Profa. Dra. Lucélia Donatti**  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

E tendo como suplente,


**Profa. Dra. Andrea Rodrigues Ávila**  
Instituto Carlos Chagas - ICC

Após arguir a mestrando **Ana Laura Grazziotin**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Hemoplasmas (micoplasmas hemotrópicos): prevalência/frequência da infecção, caracterização molecular e filogenia de hemoplasmas em cervídeos de cativeiro e vida livre do Brasil" são de parecer favorável à APROVAÇÃO da acadêmica, habilitando-a ao título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.



Curitiba, 21 de fevereiro de 2011

  
**Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade**  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Molecular - UFPR  
Matr. 185795

**Ana Laura Grazziotin**

*Médica Veterinária graduada pela  
Universidade Federal do Paraná (2003-2008)*

*À minha família que se dedica, participa  
e investe na minha educação.  
Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

À diversidade da vida por todas as possibilidades de investigação: a busca por respostas e a formulação de novas perguntas.

À minha família por todo carinho e apoio durante os meus anos de educação e por me incentivarem a seguir a carreira acadêmica. Aos meus pais, Celestina e Lauro Grazziotin, que sempre se fizeram presentes mesmo quando as atividades de pesquisa me levaram para longe. Aos meus avós, Ampélia e Romano Bonzanini (*in memoriam*), pelos sorrisos e pela felicidade sincera quando me ouviam descrever os estudos. Em especial, à minha irmã Ana Line Grazziotin, por se envolver diretamente nas atividades do mestrado, ajudar-me quando necessitava desdobrar-me em duas, ser meu apoio e minha companheira para todos os momentos!

Ao meu orientador e amigo, Alexander Biondo, pela confiança de anos, desde meus estudos na graduação. Os conselhos profissionais e pessoais, as discussões, as risadas compartilhadas entre nós foram todos passos para construir o meu caminho.

À equipe da UFPR: professor Ivan Barros e professora Lucélia Donatti pelas colaborações e pelo carinho de suas palavras de incentivo. Aos amigos que me auxiliaram nas etapas iniciais do mestrado pela prestatividade e amizade, Fernanda Monego, Sandra Curotto e Rafael Vieira.

Aos parceiros do projeto,

À equipe de ITAIPU, colegas que se tornaram amigos durante cada um dos dias de atividade. Aos amigos do Refúgio Biológico Bela Vista de Itaipu: Wanderlei de Moraes, Zalmir Cubas, Marcos de Oliveira e demais funcionários do refúgio. Aos amigos do Laboratório Ambiental de Itaipu: Leonilda Santos, Luiz Cortes, Michelle Cubila, André, Dona Oli e estagiários. A toda esta grande equipe, pela experiência e energia entregue, o conhecimento, a paciência, criatividade, carinho e por saber dividir e atuar solidariamente e permitir-me entrar em suas rotinas.

À equipe da UNESP Jaboticabal, professor José Maurício Barbanti e professor Matias Szabó por abrirem as portas do Núcleo de Pesquisas e Conservação de Cervídeos à idéia do projeto, pela confiança no trabalho, pelo permanente apoio, sábios conselhos e por compartilharem suas experiências no tema.



À equipe da PURDUE UNIVERSITY, professora Joanne Messick, Andrea Santos, Ana Márcia Guimarães e Ahmed Mohamed pela oportunidade de conviver com cada um em meu segundo ano de mestrado, por serem meus conselheiros, tutores e educadores, e muito além de amigos de laboratório, serem meus amigos para qualquer momento, nas alegrias e nas dificuldades. Agradeço pela paciência com as minhas dúvidas de laboratório e com meu inglês de recém-chegada. À professora Joanne Messick por me receber com um carinho imenso, mostrar-se uma pessoa maravilhosa e muito acessível, por me ensinar o seu modo de pensar em pesquisa e dar-me todo o seu tempo para as discussões e correções dos artigos, assim como, por se importar com o meu dia a dia na vida americana. À Andrea e à Ana Márcia por serem como irmãs mais experientes, cheias de conselhos protetores para o meu caminho, por serem meus ombros e ouvidos quando precisei de ajuda.

Aos amigos que encontrei nos EUA, com os quais compartilhei risadas, trapalhadas e lágrimas, e que levarei nas minhas lembranças e no meu coração. Em especial ao Marco Velástegui, por conquistar meu coração com seu amor pela vida, pelo seu carinho constante, sua paciência imensa, sua compaixão, por ser meu exemplo de conduta, bons valores e princípios, por cuidar de mim e ser minha família equatoriana nos EUA. À Erika Maneti por todas as suas histórias, suas risadas e loucuras, por vivenciarmos juntas várias aventuras. À Michele Menezes, por me ensinar a ser mais prática no dia a dia, por compartilhar seu lar americano comigo e ser a alegria de nossa turma de visitantes escolares no exterior.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular e à secretária Marlene Camargo por toda sua prestatividade.

À Fundação Araucária pelo apoio financeiro durante os dois anos de mestrado.

Agradeço.

*“Nunca consideres o estudo como uma obrigação,  
mas sim, como uma oportunidade de penetrar o belo e maravilhoso mundo do saber”*

Albert Einstein

*“Olhe no fundo dos olhos de um animal e, por um momento, troque de lugar com ele.  
A vida dele se tornará tão preciosa quanto a sua e você se tornará tão vulnerável quanto  
ele. Agora sorria, se você acredita que todos os animais merecem nosso respeito e nossa  
proteção, pois em determinado ponto eles são nós e nós somos eles”*

Philip Ochoa

## SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 Pesquisa de micoplasmas hemotrópicos em cervídeos de cativeiro.....	22
2.1.1 Gerais.....	22
2.1.2 Específicos.....	22
2.2 Pesquisa de micoplasmas hemotrópicos em cervídeos de vida livre.....	22
2.2.1 Gerais.....	22
2.2.2 Específicos.....	23
<b>Capítulo 1 – REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>24</b>
1. HEMOPLASMAS.....	24
1.1 Características dos hemoplasmas.....	26
1.1.1 Morfologia.....	27
1.1.2 Formas de transmissão.....	28
1.1.3 Diagnóstico.....	28
1.1.4 A doença.....	31
2. HEMOPLASMAS EM RUMINANTES DOMÉSTICOS E SELVAGENS.....	31
2.1 <i>Mycoplasma ovis</i> .....	32
2.1.1 Prevalência em animais domésticos (ovinos e caprinos).....	32
2.1.2 Prevalência em animais selvagens (caprinos e cervídeos).....	33
2.1.3 Apresentação clínica dos animais infectados por <i>M. ovis</i> .....	33
2.2 ‘ <i>Candidatus Mycoplasma haemolamae</i> ’.....	34
2.2.1 Prevalência.....	35
2.2.2 Apresentação clínica dos animais infectados por ‘ <i>Candidatus Mycoplasma haemolamae</i> ’.....	35
2.3 <i>Mycoplasma wenyonni</i> e ‘ <i>Candidatus Mycoplasma haemobos</i> ’.....	35
2.3.1 Prevalência.....	35
2.3.2 Apresentação clínica dos animais infectados por <i>M. wenyonni</i> e ‘ <i>Candidatus Mycoplasma haemobos</i> ’.....	36
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
<b>Capítulo 2 – HEMOPLASMAS EM CERVÍDEOS DE CATIVEIRO DO REFÚGIO BIOLÓGICO BELA VISTA: FILOGENIA, PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO PARA A INFECÇÃO.....</b>	<b>47</b>
RESUMO.....	47
ABSTRACT.....	48
1. INTRODUÇÃO.....	49
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
2.1 Local de estudo.....	50
2.2 Animais do estudo e coleta de amostras.....	51
2.3 Exames de patologia clínica.....	53
2.3.1 Hemogramas.....	53
2.4 Microscopia eletrônica.....	54
2.5 Extração de DNA das amostras.....	55
2.6 PCR do gene <i>housekeeping</i> .....	55
2.7 PCR para detecção de <i>Mycoplasma ovis</i> .....	56
2.8 PCR para a detecção dos genes 16S rRNA e 23S rRNA e sequenciamento.....	56
2.9 Análise filogenética.....	58

2.10 Análise estatística.....	58
3. RESULTADOS.....	58
3.1 Hematologia.....	58
3.2 Microscopia eletrônica.....	59
3.3 Prevalência de micoplasmas hemotrópicos.....	59
3.4 Caracterização molecular de micoplasmas hemotrópicos.....	60
3.5 Números de acesso às sequências dos genes 16S rRNA e 23S rRNA de hemoplasmas.....	64
3.6 Fatores de risco e alterações hematológicas associadas à infecção.....	64
4. DISCUSSÃO.....	66
5. CONCLUSÕES.....	68
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
<b>Capítulo 3 – HEMOPLASMAS EM POPULAÇÕES DE CERVÍDEOS DE VIDA LIVRE: FREQUÊNCIA DA INFECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES ENCONTRADAS.....</b>	<b>73</b>
RESUMO.....	73
ABSTRACT.....	74
1. INTRODUÇÃO.....	75
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	76
2.1 Animais do estudo e distribuição espacial.....	76
2.2 Hematologia.....	78
2.3 Extração do DNA das amostras.....	78
2.4 PCR para o gene conservado Kappa-caseína.....	78
2.5 PCR do gene 16S rRNA de <i>M. ovis</i> .....	79
2.6 PCR dos genes 16S rRNA e 23S rRNA para sequenciamento.....	79
2.7 Análise filogenética.....	80
2.8 Número de acesso das amostras no GenBank.....	80
2.9 Análise estatística.....	81
3. RESULTADOS.....	81
3.1 Frequência de micoplasmas hemotrópicos.....	81
3.2 Caracterização molecular dos micoplasmas hemotrópicos.....	82
3.3 Análise hematológica.....	86
4. DISCUSSÃO.....	86
5. CONCLUSÕES.....	88
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>92</b>
<b>APÊNDICE – CAPÍTULO 2.....</b>	<b>93</b>
<b>APÊNDICE – CAPÍTULO 3.....</b>	<b>108</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>111</b>
ANEXO 1 – PÔSTER APRESENTADO NO AMERICAN SOCIETY FOR VETERINARY CLINICAL PATHOLOGY ANNUAL MEETING, October 30-November 3, 2010, Baltimore, Maryland, USA.....	112
ANEXO 2 – ARTIGO SUBMETIDO NA REVISTA VETERINARY MICROBIOLOGY.....	113
ANEXO 3 – ARTIGO SUBMETIDO NA REVISTA JOURNAL OF WILDLIFE DISEASES.....	126

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Capítulo 1

- FIGURA 1 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE *Mycoplasma* spp. A PARTIR DE COMPARAÇÕES DAS SEQUÊNCIAS DOS GENES 16S rRNA..... 26
- FIGURA 2 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ÓTICA E ELETRÔNICA DE HEMOPLASMAS..... 27
- FIGURA 3 – GUIA PROPOSTO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS ESPÉCIES BASEADA EM SEQUÊNCIAS, INICIANDO-SE COM AS SEQUÊNCIAS DO GENE 16S rRNA..... 30

### Capítulo 2

- FIGURA 1 – RECINTO DOS CERVOS DO PANTANAL NO ZOOLOGICO ROBERTO RIBAS LANGE..... 51
- FIGURA 2 – RECINTOS DOS VEADOS BORORO E VEADOS CAMPEIRO NO CRIADOURO DE ANIMAIS SELVAGENS DE ITAIPU BINACIONAL..... 51
- FIGURA 3 – ESPÉCIES DE CERVÍDEOS DO REFÚGIO BIOLÓGICO BELA VISTA INCLUÍDAS NO PROJETO DE PESQUISA DE HEMOPLASMAS..... 52
- FIGURA 4 – CAPTURA DOS ANIMAIS E COLETA DE AMOSTRAS..... 53
- FIGURA 5 – IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA AMOSTRA 2404..... 59
- FIGURA 6 – IMAGEM DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS DO GENE DA KAPPA-CASEÍNA..... 59
- FIGURA 7 – IMAGEM DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS DO GENE DE *M. ovis*..... 60
- FIGURA 8 – ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NAS SEQUÊNCIAS DOS GENES 16S rRNA DE HEMOPLASMAS..... 61
- FIGURA 9 – ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NO GENE 16S rRNA DE HEMOPLASMAS E MICOPLASMAS NÃO HEMOTRÓPICOS..... 62
- FIGURA 10 – ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NAS SEQUÊNCIAS DOS GENES 23S rRNA DE HEMOPLASMAS E MICOPLASMAS NÃO HEMOTRÓPICOS..... 63

### Capítulo 3

- FIGURA 1 – EXEMPLOS DE PÂNTANOS E FLORESTAS SAZONALMENTE INUNDADAS ONDE CARRAPATOS FORAM COLETADOS NO ESTUDO DE SZABO ET AL. (2007)..... 77
- FIGURA 2 – IMAGEM DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS DO GENE DA KAPPA CASEÍNA..... 81

FIGURA 3 –	IMAGEM DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS DO GENE 16S rRNA DE <i>M. ovis</i> .....	82
FIGURA 4 –	ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NAS SEQUÊNCIAS DOS GENES 16S rRNA DE HEMOPLASMAS.....	84
FIGURA 5 –	ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NAS SEQUÊNCIAS DOS GENES 23S rRNA DE HEMOPLASMAS E MICOPLASMAS NÃO HEMOTRÓPICOS.....	85

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

TABELA 1 –	ESPÉCIES DE HEMOPLASMAS DESCRITAS EM SEUS RESPECTIVOS HOSPEDEIROS NATURAIS.....	24
------------	---	----

### Capítulo 2

TABELA 1 –	VALORES HEMATOLÓGICOS DE REFERÊNCIA PARA AS ESPÉCIES DE CERVÍDEOS ESTUDADAS.....	54
TABELA 2 –	<i>Primers</i> USADOS PARA AMPLICAÇÃO DOS GENES DA KAPPA-CASEÍNA, 16S rRNA E 23S rRNA.....	57
TABELA 3 –	ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA OS FATORES DE RISCO (ESPÉCIE, SEXO, IDADE, PROCEDÊNCIA E PRESENÇA DE CARRAPATOS) E ANORMALIDADES HEMATOLÓGICAS (PPT, Ht% E CONTAGEM DE CÉLULAS BRANCAS) ASSOCIADOS A INFECÇÃO POR HEMOPLASMAS NO GRUPO DE ANIMAIS EXAMINADO.....	65

### Capítulo 3

TABELA 1 –	VALORES HEMATÓLOGICOS DE REFERÊNCIA PARA <i>Blastocerus dichotomus</i> .....	78
TABELA 2 –	<i>Primers</i> USADOS PARA AMPLICAÇÃO DOS GENES DA KAPPA-CASEÍNA, 16S rRNA E 23S rRNA.....	80
TABELA 3 –	IDENTIDADES (%) ENTRE AS SEQUÊNCIAS PELO VALOR ENCONTRADO NA MATRIX DE DISTÂNCIAS.....	83
TABELA 4 –	ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA AS ANORMALIDADES HEMATOLÓGICAS (Ht%, PPT) ASSOCIADAS À INFECÇÃO POR HEMOPLASMAS NO GRUPO DE ANIMAIS EXAMINADO.....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	- Símbolo de percentagem
<	- Símbolo de menor que
=	- Símbolo de igual a
±	- Símbolo de mais ou menos
®	- Símbolo de marca registrada
°C	- Graus centígrados
16S rRNA	- Parte da subunidade pequena (30S) do ácido ribonucleico ribossomal de procariotos
23S rRNA	- Parte da subunidade grande (50S) do ácido ribonucleico ribossomal de procariotos
25°32'45"S, 54°35'07"O	- Coordenadas geográficas indicando graus, minutos e segundos, latitudes (Norte ou Sul) e longitudes (Leste ou Oeste)
3'	- Símbolo da extremidade três linha ou OH (oxidrila) livre
5'	- Símbolo da extremidade cinco linha ou H (hidroxila) livre
BLASTn	- Basic Local Alignment Search Tool nucleotide
CASIB	- Criadouro de Animais Silvestres de Itaipu Binacional
CITES	- Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies Ameaçadas da Fauna e da Flora Selvagens
Corp.	- Corporação
DNA	- Ácido desoxiribonucleico
dNTP	- Deoxinucleosídeo trifosfato (dATP – deoxiadenosina, dGTP - deoxiguanosina, dCTP - deoxicitidina, dTTP – deoxitirosina)
EDTA	- Ácido etileno-diamino-tetra-acético
EMBRAPA	- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
et al.	- e outros
EUA	- Estados Unidos da América
Fw	- Forward
g/dL	- Gramas por decilitro
g/L	- Gramas por litro
Ht%	- Hematócrito
IBAMA	- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis
Inc.	- Incorporação



ISIS	- International Species Information System
IUCN	- International Union for Conservation of Nature
Kb	- Kilobases
L/L	- Litro por litro
Ladder	- Marcador de peso molecular
MEGA 4	- Molecular Evolucionary Genetics Analysis
mg/kg	- Miligramas por kilogramas
MgCl <sub>2</sub>	- Cloreto de magnésio
Min	- Minutos
Seg	- Segundos
mL	- Mililitros
mM	- Milimol
mm <sup>3</sup>	- Milímetros cúbicos
N	- Tamanho de amostra
NaCl	- Cloreto de Sódio
nm	- Nanômetros
NUPECCE	- Núcleo de Pesquisas e Conservação de Cervídeos
<i>P</i>	- Valor de p
Pb	- Pares de bases
PCR	- Polymerase Chain Reaction
pH	- Potencial hidrogeniônico
ppt	- Proteína plasmática total
<i>Primers</i>	- Iniciadores oligonucleotídeos
RNAse P	- Ribonuclease P
<i>rpoB</i>	- Subunidade β da RNA polimerase
Rv	- Reverse
™	- Símbolo de trade market / Mercado de comércio
Tm	- Símbolo de melting temperature / temperature de anelamento
Tris-HCl	- Tris-hidroximetil-aminometano-ácido clorídrico
U	- Unidades
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
UNESP	- Universidade Estadual Paulista
UV	- Ultra violeta
V	- Volts
X	- Vezes
x10 <sup>3</sup>	- Vezes 1.000

Zoo RRL	- Zoológico Roberto Ribas Lange
$\mu\text{L}$	- Microlitros
$\mu\text{m}$	- Micrômetros
$\text{pmol}$	- Pico mol

## RESUMO

Os micoplasmas hemotrópicos ou hemoplasmas são parasitas epiteliais dos eritrócitos. Estas bactérias de reduzido tamanho e desprovidas de parede celular, pertencem à ordem dos Mollicutes e ao gênero *Mycoplasma*, baseado no sequenciamento e filogenia das sequências do gene 16S rRNA. Os organismos já foram descritos em animais domésticos, selvagens e de laboratório e até mesmo, em seres humanos. A doença segue dois cursos distintos: a doença aguda e a doença crônica. No Brasil, a infecção tem sido relatada em seres humanos, gatos, cães, porcos e animais silvestres como felídeos e capivaras de cativeiro. Espécies novas de hemoplasmas ou novos hospedeiros para os organismos foram identificadas nos estudos da infecção ao redor do mundo. Cervídeos da América do Norte e do Japão foram identificados como hospedeiros de *Mycoplasma ovis* e de outras duas novas espécies propostas de micoplasmas. Este trabalho propôs o estudo da infecção por hemoplasmas em cervídeos brasileiros de cativeiro e de vida livre. Esta dissertação apresenta primeiramente um capítulo de revisão sobre as características, epidemiologia e diagnóstico da infecção por hemoplasmas. Em seguida, relatam-se dois trabalhos de investigação molecular no diagnóstico de hemoplasmas, caracterização molecular e filogenia das espécies encontradas em 1) cervídeos brasileiros de cativeiro da Usina Hidrelétrica de Itaipu Binacional e em 2) cervídeos de vida livre de três regiões geográficas distintas: na Usina de Porto Primavera situada em São Paulo, nas fazendas da região do Pantanal no Mato Grosso do Sul e nas áreas do Parque Nacional das Emas em Goiás. No primeiro trabalho, 32 cervídeos (*Blastocercus dichotomus*, *Mazama nana*, *M. americana*) foram testados para *M. ovis* por meio da técnica de PCR, as amostras positivas foram sequenciadas para os genes 16S e 23S rRNA de hemoplasmas e então construiu-se a árvore filogenética comparativa a outros micoplasmas. Vinte e sete (87%) animais foram positivos, encontrando-se após o sequenciamento espécies proximalmente relacionadas ao *M. ovis* e ao 'Candidatus Mycoplasma erythrocervae' e por fim, uma nova espécie foi proposta neste trabalho, o 'Candidatus Mycoplasma dichotomae'. No segundo trabalho, dos 103 cervídeos testados (*B. dichotomus* e *O. bezoarticus*), 60 (58,2%) foram positivos. Destes, foram positivos 46/64 (71,8%) animais de Porto Primavera, 10/18 (55,5%) do Pantanal e 4/21 (19%) do Parque Nacional das Emas. Dentre as amostras caracterizadas (30% dos positivos), encontraram-se as espécies relacionadas ao *M. ovis*, ao 'Candidatus Mycoplasma erythrocervae' e ao 'Candidatus Mycoplasma dichotomae'. Os resultados mostram a presença das espécies de hemoplasmas em cervídeos de diferentes regiões geográficas brasileiras em ambas as condições de habitat, cativeiro e vida livre. Os estudos reforçam a importância da investigação da infecção por hemoplasmas em animais selvagens e dos estudos de caracterização molecular para identificação de novas espécies da bactéria nestes hospedeiros. Palavras-chave: Brasil, 'Candidatus Mycoplasma dichotomae', cervídeos, frequência, gene 23S rRNA, hemoplasma, *Mycoplasma ovis*, prevalência.

## ABSTRACT

Hemotropic mycoplasmas or hemoplasmas are epicellular parasites of erythrocytes. They are small cell-wall less bacteria that belong to the Mollicutes order and to *Mycoplasma* genera based on characterization and phylogeny of their 16S rRNA gene sequences. Hemoplasmas have been described infecting domestic, wild and laboratory animals and also, human beings. Acute and chronic diseases are both forms of hemoplasma infection described in many host species. Hemoplasma infection has been described in humans, cats, dogs, pigs, captive and wild animals as felids and capybaras from Brazil. Novel hemoplasma species and hosts for the bacteria have been identified around the world. North American and Japanese cervids were identified as *M. ovis* hosts. Besides, two proposed novel hemoplasmas species were found in these deer. Therefore, we proposed the study of hemoplasma infection in captive and free-ranging Brazilian deer. The content of this dissertation is separated in three chapters: a review chapter about features, epidemiology and diagnoses of hemoplasma infections followed by two studies on molecular investigation, diagnoses, characterization and phylogeny of hemoplasma species identified in Brazilian deer. In the second chapter, 32 captive deer (*Blastocerus dichotomus*, *Mazama nana*, *M. americana*) kept at Itaipu Binational Dam areas were tested. *M. ovis* PCR were performed and the positive samples were sequenced to 16S and 23S rRNA gene sequences. The phylogenetic trees were constructed. Twenty seven (87%) animals were positive and sequences were closely related to *M. ovis* and 'Candidatus Mycoplasma erythrocervae'. Beside this, a novel hemoplasma species was found and proposed as 'Candidatus Mycoplasma dichotomae'. The second chapter described the hemoplasma study with 103 free-ranging deer (*B. dichotomus* e *O. bezoarticus*) from 3 geographically distinct regions: Porto Primavera Dam areas (Sao Paulo), Pantanal areas (Mato Grosso do Sul) and from Emas National Park areas (Goias). Sixty (58.2%) animals were positive, including 46/64 (71.8%) from Porto Primavera, 10/18 (55.5%) from Pantanal and 4/21 (19%) from Emas National Park. Third percent of positive samples were sequenced and analyzed. The sequences were closely related to *M. ovis*, 'Candidatus Mycoplasma erythrocervae' and 'Candidatus Mycoplasma dichotomae'. Our results show the presence of hemoplasma species infecting deer from different geographic Brazilian regions under distinct habitat conditions: in wild and captivity. These studies reinforce the importance of hemoplasma investigations in wild animals and on molecular characterization to identify unknown species in those hosts.

Key word: 23S rRNA gene, Brazil, 'Candidatus Mycoplasma dichotomae', deer, frequency, hemoplasma, *Mycoplasma ovis*, prevalence.

## 1. INTRODUÇÃO

“A doença na população selvagem raramente é uma situação simples, unicausal e de único efeito. Usualmente ela é um produto de profundas mudanças no meio ambiente” Lars Karstad (1971).

As comunidades de organismos sofrem mudanças e declínios ou aumentos populacionais ao longo do tempo ecológico, porém a intervenção humana pode acelerar estes processos. Os impactos diretos são principalmente a destruição de habitats, poluição, introdução de espécies e disseminação de doenças (Hero e Ridgway, 2006). A fragmentação do habitat resulta em retração populacional das diferentes espécies e perda da diversidade genética, favorecendo a ocorrência e proliferação de doenças entre os animais (Murray et al., 1999).

Citam-se pelo menos quatro motivos para se estudar as doenças em animais silvestres. Animais domésticos assim como animais silvestres podem ser reservatórios ou vetores de agentes patogênicos transmissíveis entre ambos e mesmo ao homem. A fragmentação do habitat concentra as populações e o estresse a que estão sujeitos predispõe os animais às doenças em níveis superiores ao esperado. Doenças emergentes colocam em risco populações ameaçadas e prejudicam a conservação da biodiversidade global. As doenças são mais um item dentro de um vasto espectro de preocupações no gerenciamento ambiental, relacionadas também a outros aspectos como as necessidades ambientais, os hábitos alimentares e a dinâmica populacional dos animais, merecedoras de atenção integrada (Bolen e Robinson, 2003).

Os animais silvestres atuam como reservatórios de agentes patogênicos e mesmo como primeiro alvo de uma doença, podendo ser considerados como sentinelas na detecção e monitoramento de zoonoses (Trainer, 1970). Assim, houve um crescente interesse no estudo de doenças em cervídeos, principalmente pelos países que possuem criatórios com finalidade comercial, devido aos prejuízos econômicos resultantes e pelo potencial risco aos consumidores da carne (Texas Agriculture Extension Service, 1914). Entretanto, as informações sobre o estado de saúde dos cervídeos de cativeiro e de vida livre permanecem limitadas, sendo em grande parte, literatura internacional.

Um grande número de doenças infecciosas e parasitárias pode potencialmente impactar as populações de cervídeos. Estudos de soroprevalência de doenças dos ruminantes em cervídeos foram realizados em países como os Estados Unidos (Trainer, 1969), México (Martinez et al., 1999) e Bolívia (Deem et al., 2004). Nos Estados Unidos, entre os 1300 cervídeos estudados, encontrou-se prevalência de 30% para arboviroses (Trainer, 1969); no México, de 350 cervídeos, 81% foram soropositivos para língua azul, 72% para doença

hemorrágica epizootica, 3% para *Borrelia burgdorferi*, 69% para *Anaplasma marginale* (Martinez et al., 1999) e na Bolívia, de 17 cervídeos, encontrou-se 13% soropositivos para o vírus sincicial respiratório bovino, 6,7% soropositivos para doença hemorrágica epizootica e 45,4% para leptospirose (Deem et al., 2004).

No Brasil, existem poucos relatos sobre a prevalência de doenças infecciosas e parasitárias em cervídeos. Em estudo com 107 cervídeos (*Blastocerus dichotomus* e *Odocoileus virginianus*) provenientes do estado de São Paulo e Goiás, encontrou-se 23% dos animais soropositivos para *Toxoplasma gondii*, sendo o maior grupo (32%) de cervídeos adultos jovens (Ferreira et al., 1997); de 17 cervídeos (*Ozotoceros bezoarticus*) estudados no Pantanal Matogrossense e de 24 provenientes do Parque Nacional das Emas em Goiás, não houve soropositivos para *Brucella abortus* nos dois grupos, porém 24% dos animais do Pantanal Matogrossense foram positivos para *Leptospira interrogans* sorovares *hardjo*, *wolfi* e *mini*, enquanto entre os animais do Parque das Emas não houve soropositivos (Mathias et al., 1999).

Considerando os hemoplasmas (micoplasmas hemotrópicos) em cervídeos, até o momento encontram-se apenas dois relatos na literatura. *Mycoplasma ovis* foi descrito em renas (*Rangifer tarandus*) dos Estados Unidos (Stoffregen et al., 2006) e em veados sika japonês (*Cervus nippon*) do Japão (Watanabe et al, *in press*). Duas novas espécies de hemoplasmas encontradas nos veados sika japonês foram propostas por Watanabe et al. (*in press*), ‘*Candidatus Mycoplasma erythroceruae*’ e ‘*Candidatus Mycoplasma haemocervae*’. *Mycoplasma ovis* foi relacionado ao quadro de anemia, letargia, edema de membros e até mesmo óbitos nos animais infectados (Stoffregen et al., 2006), enquanto para as duas novas espécies propostas não foi realizado estudo sobre as complicações clínicas nos animais infectados.

No Brasil, não existem relatos sobre a presença de micoplasmas hemotrópicos e suas implicações sanitárias nos cervídeos brasileiros. Considerando a fragilidade das populações de cervídeos pela interferência humana e a possibilidade de transmissão de agentes patogênicos entre animais silvestres, animais domésticos e seres humanos, os estudos para se determinar a presença e o impacto das enfermidades nos animais silvestres de vida livre e cativeiro, fazem-se necessários.

O projeto de pesquisa de micoplasmas hemotrópicos em cervídeos de cativeiro e de vida livre fez parte um amplo estudo de monitoramento ativo de doenças em cervídeos brasileiros o qual objetivou auxiliar na compreensão da biologia, do estado de saúde, da parasitologia e das enfermidades infecciosas destes animais, visando à proteção e conservação das espécies. A parceria da Universidade Federal do Paraná com o Refúgio Biológico Bela Vista - ITAIPU Binacional, com o Núcleo de Pesquisas e Conservação de Cervídeos – UNESP Jaboticabal, com o Laboratório de Micoplasmas Hemotrópicos da

Universidade de Purdue e com o Instituto Biológico de São Paulo, permitiu a complementaridade da pesquisa, o fortalecimento do grupo pelos conhecimentos multidisciplinares e uma vasta abordagem sobre o tema no entendimento da vida e conservação das espécies estudadas. Os resultados poderão ser utilizados por zoológicos, criatórios e unidades de conservação, incluindo em suas rotinas de manejo o diagnóstico de hemoplasmoses entre as demais doenças avaliadas, além de contribuírem com os indicadores necessários para maior informação sobre as espécies.

O projeto de pesquisa de hemoplasmas em cervídeos brasileiros foi conduzido em duas linhas de trabalho separadamente. O primeiro trabalho abordou a pesquisa de hemoplasmas em cervídeos de cativeiro mantidos no Refúgio Biológico Bela Vista – ITAIPU Binacional, enquanto o segundo trabalho foi realizado em distintas populações de cervídeos de vida livre a partir das amostras pertencentes à UNESP Jaboticabal. Esta dissertação foi elaborada em três capítulos e seus respectivos anexos, devido as diferentes abordagens adotadas no projeto. Deste modo, o primeiro capítulo apresenta uma breve revisão sobre o material de estudo – os hemoplasmas. O segundo capítulo apresenta a descrição do primeiro artigo submetido na revista *Veterinary Microbiology*, “*Mycoplasma ovis* and a novel hemotropic mycoplasma in captive cervids: phylogeny, prevalence, and analysis of potential risk factors for infection”. O terceiro capítulo apresenta os resultados da pesquisa de hemoplasma nos cervídeos de vida livre e segundo artigo submetido no *Journal of Wildlife Diseases*, “Frequency of infection and molecular characterization of *Mycoplasma ovis* in free-ranging deer populations from Brazil”.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Pesquisa de micoplasmas hemotrópicos em cervídeos de cativeiro

#### 2.1.1 Gerais

- Contribuir com as atividades em prol da conservação das espécies de cervídeos silvestres em cativeiro ameaçados de extinção através dos estudos de sanidade animal no plantel do Refúgio Biológico Bela Vista por meio da Usina Hidrelétrica de ITAIPU Binacional.
- Detectar a presença de bactérias do gênero *Mycoplasma* em amostras de sangue dos cervídeos de cativeiro do Refúgio Biológico Bela Vista, pela microscopia ótica nas extensões de sangue em lâmina e pela triagem molecular por reação em cadeia da polimerase (PCR) usando primers específicos para hemoplasmas que amplificam o gene 16S rRNA das bactérias.

#### 2.1.2 Específicos

- Realizar o exame físico, com inspeção dos sinais clínicos dos animais durante a contação.
- Identificar a espécie da bactéria encontrada.
- Determinar a patogenicidade do microorganismo nos cervídeos através da relação: sinais clínicos apresentados e achados de patologia clínica dos animais X presença da bactéria.
- Realizar a análise filogenética para a espécie de hemoplasma cujo produto for obtido na amplificação por PCR e sequenciamento.
- Determinar os fatores de risco para a infecção.
- Determinar a importância dos cervídeos como reservatório de *Mycoplasma* spp. hemotrópicos.

### 2.2 Pesquisa de micoplasmas hemotrópicos em cervídeos de vida livre

#### 2.2.1 Gerais

- Determinar a frequência e a distribuição da infecção por hemoplasmas em cervídeos de vida livre em diferentes habitats no Brasil;



### 2.2.2 Específicos

- Detectar molecularmente a presença de micoplasmas hemotrópicos a partir de amostras de sangue de cervídeos de vida livre;
- Realizar a caracterização molecular e filogenia das espécies de microorganismos encontrados.

## Capítulo 1 – REVISÃO DE LITERATURA

### 1. HEMOPLASMAS

Hemoplasmas ou micoplasmas hemotrópicos são bactérias de pequeno tamanho, desprovidas de parede celular, de característica pleomórfica, capazes de atacar a superfície e parasitar as células vermelhas de uma ampla variedade de hospedeiros mamíferos. Os organismos já foram descritos infectando animais domésticos, selvagens e de laboratório como alpacas, bovinos, camundongos, canídeos, capivaras, caprinos, cervídeos, felídeos, gambás, guaxinins, leões marinhos, lhamas, macacos, morcegos, ovinos, suínos e ratos (TABELA 1). Os parasitas são comumente descritos como sendo hospedeiro-específicos uma vez que em geral, os organismos são encontrados em único hospedeiro e por isso foram nominados conforme a espécie animal na qual foram identificados. Entretanto, encontram-se vários relatos na literatura de infecções em outros hospedeiros que não habituais, além de co-infecção por diferentes espécies de hemoplasmas em um mesmo hospedeiro. Seres humanos imunossuprimidos já foram diagnosticados para hemoplasmas de felídeos e de ovinos, evidenciando o potencial zoonótico destes parasitas (Sykes et al., 2010; Hu et al., 2009; Santos et al., 2008; Yang et al., 2000).

HOSPEDEIRO	HEMOPLASMA	REFERÊNCIAS
Alpaca e lhama	' <i>Candidatus</i> <i>Mycoplasma haemolamae</i> '	McLaughlin et al., 1990; Messick et al., 2002
Bovinos	<i>Mycoplasma wenyonii</i> , ' <i>Candidatus</i> <i>M. haemobos</i> ', <i>Eperythrozoon teganodes</i> , <i>E. tuomii</i>	Meli et al., 2010; Anziani et al., 1982; Uilenberg, 1967
Camundongo e ratos	<i>M. coccoides</i> , <i>M. haemomuris</i>	Bidwell e Voller, 1967; Bartlett e Pease, 1975
Canídeos	<i>M. haemocanis</i> e ' <i>Candidatus</i> <i>M. haematoparvum</i> '	Roura et al., 2010
Capivara	<i>Mycoplasma</i> spp.	Vieira et al., 2009
Caprinos e ovinos	<i>M. ovis</i>	Neimark et al., 2004; Mason et al., 1989
Cervídeos	<i>M. ovis</i> , ' <i>Candidatus</i> <i>M. erythroceruae</i> ', ' <i>Candidatus</i> <i>M. haemocervae</i> '	Stoffregen et al., 2006; Boes et al, não publicado; Watanabe et al., <i>in press</i>
Felídeos	<i>M. haemofelis</i> , <i>M. haemominutum</i> , <i>M. turicensis</i>	Willi et al., 2007; Santos et al., 2009
Gambá	' <i>Candidatus</i> <i>M. haemodidelphidis</i> '	Messick et al., 2000
Guaxinim	<i>Haemobartonella procyoni</i>	Frerichs e Holbrook, 1971
Leão marinho	' <i>Candidatus</i> <i>M. haemozalophi</i> '	Volokhov et al., <i>in press</i>
Macaco	' <i>Candidatus</i> <i>M. kahanei</i> '	Neimark et al., 2002a
Morcego	<i>E. mariboi</i>	Ewers, 1971
Suínos	<i>M. suis</i> , <i>E. parvum</i>	Yuan et al., 2009; Hoelzle et al., 2010; Uilenberger et al., 1981

TABELA 1 - ESPÉCIES DE HEMOPLASMAS DESCRITAS EM SEUS RESPECTIVOS HOSPEDEIROS NATURAIS  
 FONTE: o autor (2010)

Os hemoplasmas foram antigamente classificados como pertencentes aos gêneros *Haemobartonella* e *Eperythrozoon* na família Anaplasmataceae (ordem Rickettsiales), devido as características de morfologia, de transmissão via vetores artrópodes e por serem parasitas de eritrócitos (Kreier e Ristic, 1984). Entretanto, o pequeno tamanho, a ausência de parede celular e de flagelos, o não crescimento em cultivo e a resistência à penicilina aproximavam estas bactérias às características da família Micoplasmataceae. Estudos de filogenia destas bactérias, iniciados com *Haemobartonella felis*, *H. muris*, *Eperythrozoon suis* e *E. wenyonni*, baseados na análise comparativa das sequências dos genes 16S rRNA evidenciaram que estes organismos são geneticamente relacionados ao gênero *Mycoplasma* (Rikihisa et al., 1997; Neimark e Kocan, 1997). A partir disso, Neimark et al. (2001) propõe a mudança das quatro espécies estudadas para o gênero *Mycoplasma* sob as denominações ‘*Candidatus Mycoplasma haemofelis*’, ‘*Candidatus Mycoplasma haemomuris*’, ‘*Candidatus Mycoplasma haemosuis*’ e ‘*Candidatus Mycoplasma wenyonni*’. A designação ‘*Candidatus*’ é de caráter provisório aplicada para novas taxa de procariotos para os quais os dados moleculares são disponíveis, enquanto os dados de outras características requeridos pelo *Rules of the Bacteriological Code* para descrição ainda sejam incompletos. Em 2002(b), Neimark et al., propõe a mudança de nome das quatro espécies para *Mycoplasma haemofelis*, *M. haemomuris*, *M. haemosuis* e *M. wenyonni*.

Os organismos da ordem Mollicutes, separam-se em 8 gêneros (*Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Spiroplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasm*, *Asteroleplasma*, *Mesoplasma* e *Entomoplasma*) (Tully et al., 1993). O gênero *Mycoplasma* por sua vez é separado em dois grupos devido as características filogenéticas e propriedades biológicas específicas diferentes, sendo o grupo pneumoniae (micoplasmas de mucosa) e o grupo dos hemoplasmas (FIGURA 1).

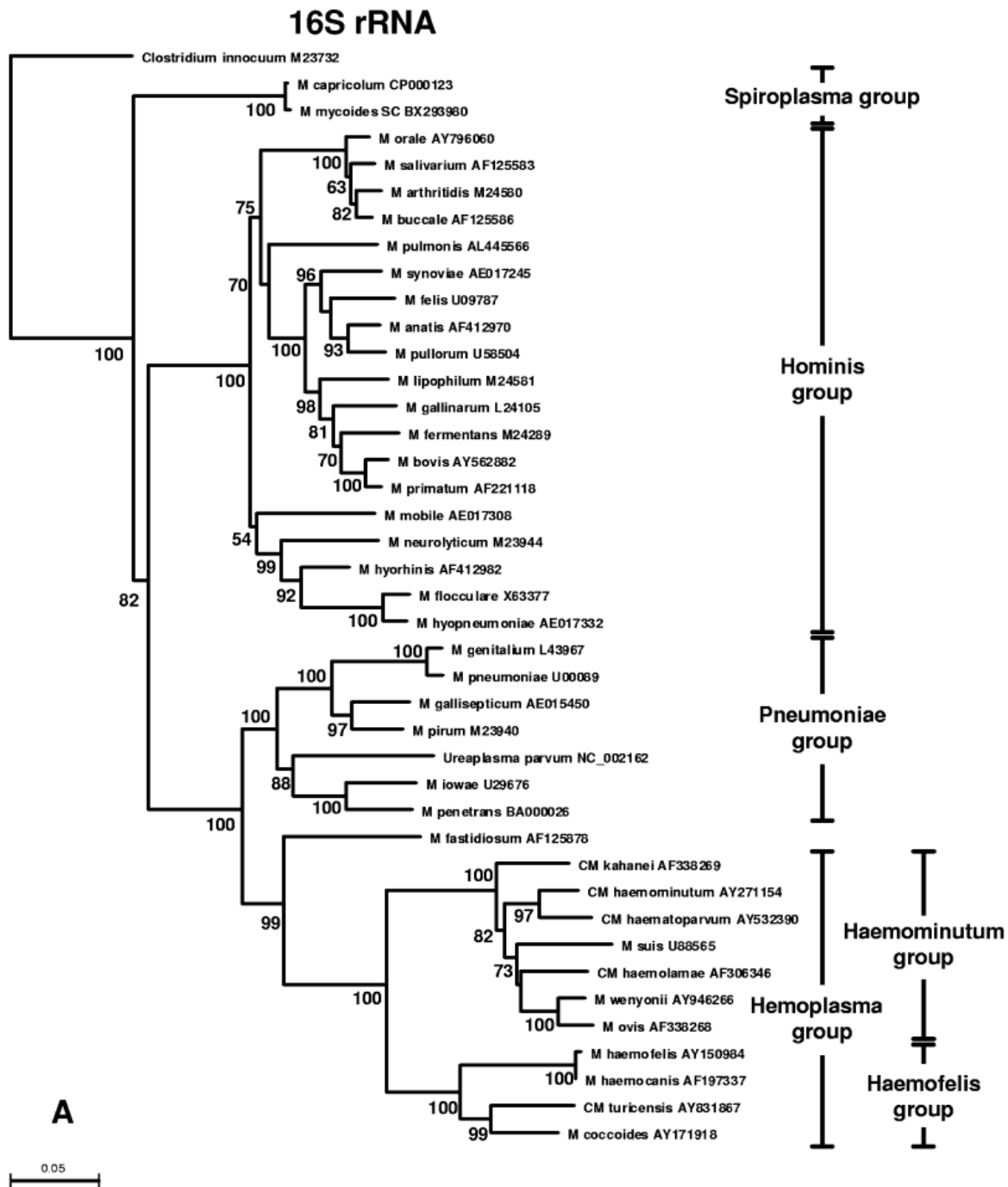


FIGURA 1 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DE *Mycoplasma* spp. A PARTIR DE COMPARAÇÕES DAS SEQUÊNCIAS DOS GENES 16S rRNA.

FONTE: Peters et al.,2008.

### 1.1 Características dos hemoplasmas

Os hemoplasmas, assim como os demais micoplasmas, são desprovidos de parede celular e mantém o menor genoma não viral conhecido. Possuem ribossomos e DNA circular fita dupla, com tamanho de genoma variando de 580 kb à aproximadamente 2.000 kb (Razin, 1992; Berent e Messick, 2003). Assim, acredita-se que durante a evolução tenha havido a

perda de algumas vias metabólicas e em consequência, os hemoplasmas mantiveram apenas os genes essenciais à sobrevivência (replicação, transcrição e síntese proteica), adotando uma forma de vida parasitária para o aproveitamento da maquinaria de síntese da célula hospedeira (Woese, 1987). Estudos sobre a via metabólica dos hemoplasmas mostram que os organismos incorporam glicose, colesterol, aminoácidos e vitaminas provenientes do exterior, o que os torna dependentes da associação aos eritrócitos (Miles, 1992).

### 1.1.1 Morfologia

Devido a ausência de uma parede celular, os hemoplasmas são pleomórficos e são observados sob diferentes formas. Nas extensões sanguíneas coradas em lâmina e visualizadas na microscopia ótica, os organismos podem se apresentar na forma cocóide, de bastão e de anel, estando individualizados ou associados em cadeias na superfície da hemácia (FIGURA 2a). Na microscopia eletrônica os organismos são encontrados em depressões rasas ou invaginações profundas na superfície dos eritrócitos (FIGURA 2b) (Portianski et al., 2004). Nos achados de microscopia eletrônica os hemoplasmas apresentam-se nas mesmas variadas formas encontradas em lâmina, podem ou não ser observadas estruturas nucleares, assim como grânulos no citoplasma e a membrana celular. A presença de fibrilas do organismo em direção à célula vermelha já foi observada, sugerindo uma forma ligação entre parasito-hospedeiro (Neimark et al., 2004).

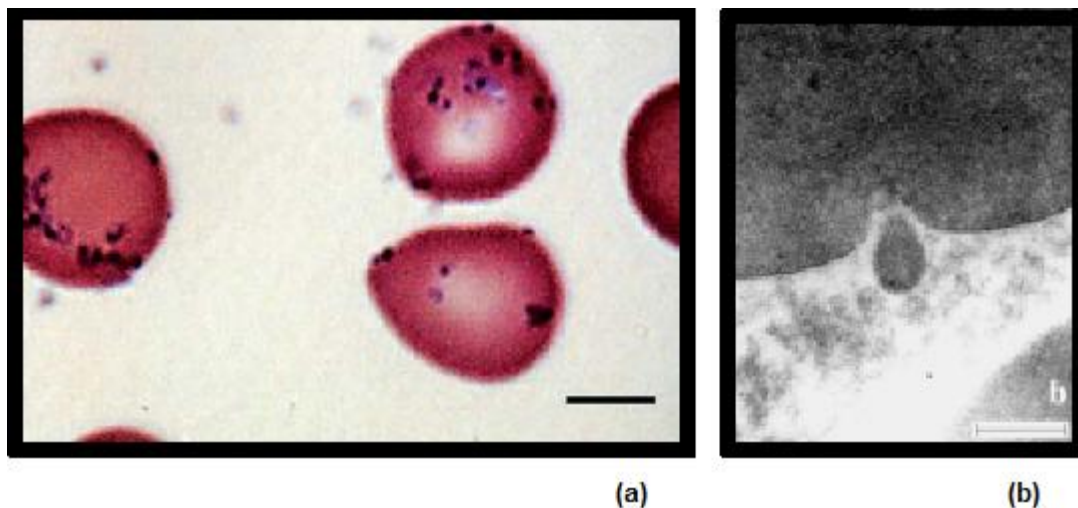


FIGURA 2 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ÓTICA E ELETRÔNICA DE HEMOPLASMAS. (a) Microscopia de luz de '*Candidatus M. haemodidelphi*' observados individualmente ou em cadeias na superfície das células vermelhas (coloração de Wright's-Giemsa, barra representa 5 µm). (b) Microscopia eletrônica de transmissão de *M. suis* mostrando a depressão formada na hemácia (barra representa 400 µm).

FONTE: (a) Messick, 2004 e (b) Portianski et al., 2004.

### 1.1.2 Formas de transmissão

No ciclo epidemiológico da doença, os carrapatos têm sido implicados como vetores na transmissão de hemoplasmas para as espécies de mamíferos suscetíveis. ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ e ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ (hemoplasmas de felídeos) foram identificados em *Rhipicephalus sanguineus* coletados em leões na África (Fyumagwa et al., 2008). ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ foi detectado em *Ixodes* sp. coletados em gatos domésticos na Suíça (Willi et al., 2007) e em *Ixodes ovatus* coletados na vegetação no Japão (Taroura et al., 2005). Pulgas têm sido implicadas na transmissão de hemoplasmas devido à detecção de DNA dos hemoparasitas nos insetos (Hackett et al., 2006). Entretanto, estudos de infecção experimental de *M. haemofelis* e *M. haemominutum* entre gatos e pulgas (*Ctenocephalides felis*) mostraram que embora as pulgas sejam aptas a se infectar com os hemoparasitas, são ineficientes para transmitir a bactéria (Woods et al., 2006).

Outras formas de transmissão dos hemoplasmas podem estar relacionadas às diferentes condições de vida e biologia dos hospedeiros. Em felinos por exemplo, as análises de fator de risco entre animais infectados, mostrou que a prevalência de infecção em gatos machos e em gatos com acesso a rua é significativa possivelmente sendo devido aos hábitos de briga e contato com sangue de ferida de animais infectados, assim como à presença de carrapatos no ambiente (Willi et al., 2006). A presença de DNA de hemoplasma de felinos já foi descrita em saliva e fezes de dois gatos (Willi et al., 2007). Em criações de suínos a infecção por hemoplasmas tem sido atribuída a alta densidade populacional, permitindo contato próximo entre animais; ao contato com sangue de ferida devido a brigas e ao contato direto matriz infectada-leitão (Hoelzle et al., 2010). A transmissão transplacentária tem sido sugerida na transmissão de hemoplasmas entre mães e filhotes em suínos e alpacas (Berrier e Gouge, 1954; Almy et al., 2006).

### 1.1.3 Diagnóstico

Na observação das extensões sanguíneas por meio da microscopia ótica, as colorações de Romanowsky (Sutton, 1970), Wright-Giemsa (Brun-Hansen et al., 1997) e laranja de acrina (Brun-Hansen et al., 1997) são utilizadas. A coloração de acridina tem se apresentado mais eficiente para a demonstrar a presença dos organismos quando os mesmos não são demonstrados por Romanowsky (Brun-Hansen et al., 1997). Entretanto, pela característica transitória do parasita no sangue e pela semelhança aos corpúsculos de Howell-Jolly, assim como, aos precipitados da coloração, a identificação do parasita em lâmina tem sido considerada uma técnica pouco confiável para o diagnóstico dos hemoplasmas (Berent et al.,

1998). Além disso, a identificação e diferenciação das espécies de hemoplasmas apenas pela microscopia ótica é difícil de ser realizada.

O isolamento dos hemoplasmas em meio de cultivo até o momento não foi possível. Devido a isso estudos bioquímicos, fenotípicos e de diagnóstico sorológicos tornam-se difíceis ou apresentam limitações (Razin et. al, 1998). Assim, técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações e o sequenciamento dos genes são os métodos de escolha para a detecção e caracterização dos hemoplasmas.

As técnicas de PCR desenvolvidas para o diagnóstico dos hemoplasmas são baseadas na detecção de um fragmento específico do gene 16S rRNA da bactéria em questão a partir da amostra (sangue total ou outro tecido) do animal infectado. Vários *primers* têm sido relatados para o diagnóstico por PCR convencional, real-time PCR (TaqMan ou Sybr Green) e para o sequenciamento das espécies de hemoplasmas em diferentes hospedeiros. Assim, trabalhos de filogenia das espécies de hemoplasmas são frequentes na literatura e em muitos casos, novas linhagens variantes ou novas espécies de hemoplasmas são relatadas.

A sequência do gene 16S rRNA possui um comprimento aproximado de 1.550 pb, incluindo regiões conservadas e regiões variáveis (Clarridge, 2004). As regiões conservadas do gene 16S rRNA e comuns entre as bactérias são escolhidas para o desenho de primers universais alcançando quase a totalidade da sequência para amplificação e sequenciamento, enquanto as regiões variáveis internas são usadas para estudos de taxonomia comparada (Chen et al., 1989; Relman, 1999). Dos 20 milhões de sequências depositadas no GenBank, 90 mil são sequências do gene 16S rRNA. Isso significa que estão disponíveis muitas sequências contra as quais possa se realizar estudos de comparação de sequências para linhagens ainda desconhecidas.

O grau de conservação de um gene demonstra sua importância nas funções celulares mais críticas ou essenciais. O gene 16S rRNA, diferente da maioria dos genes, é altamente conservado e por esta razão é o mais comumente usado para estudos taxonômicos de bactérias (Kolbert et al., 1999; Palys et al., 1997). Outros candidatos seriam os genes que codificam para o 5S e o 23S rRNA, *groEL*, *rpoB* e os espaços entre estes genes, por exemplo.

Quando a comparação das sequências apresenta a possibilidade de uma nova espécie, análises mais profundas devem ser realizadas para a sua descrição (FIGURA 3). Segundo Drancourt e Raoult (2005), “*two bacterial isolates would belong to different species if the similarity in the 16S rRNA gene sequence between them were less than 97%*”. Entretanto, apenas a análise de identidades entre sequências do gene 16S rRNA não são consideradas suficientes, havendo a necessidade de avaliar outras condições relacionadas ao novo isolado como: a fonte de isolamento e se forem de amostras clínicas, devem ser observados os locais do tecido de onde foram amostrados, se há quadro clínico de imunossupressão e histórico de exposição, assim como características fenotípicas, bioquímicas e microscópicas. Embora não

haja consenso na literatura sobre o número de isolados caracterizados requeridos para descrição de uma nova espécie, os mesmos autores sugerem o estudo de pelo menos cinco isolados geograficamente distintos. E ainda, que a nomeação da nova espécie é desejável.

Para o caso de novas espécies de hemoplasmas, características fenotípicas e bioquímicas são difíceis de serem descritas devido a impossibilidade de cultivo e de manutenção dos organismos *in vitro*. Deste modo, os estudos de novas espécies de hemoplasmas baseiam-se na análise complementar de distâncias entre as sequências de outros genes. As sequências mais comumente usadas são o gene RNase P e o 23S rRNA (Volkhov et al., *in press*; Peters et al., 2008; Tasker et al., 2003).

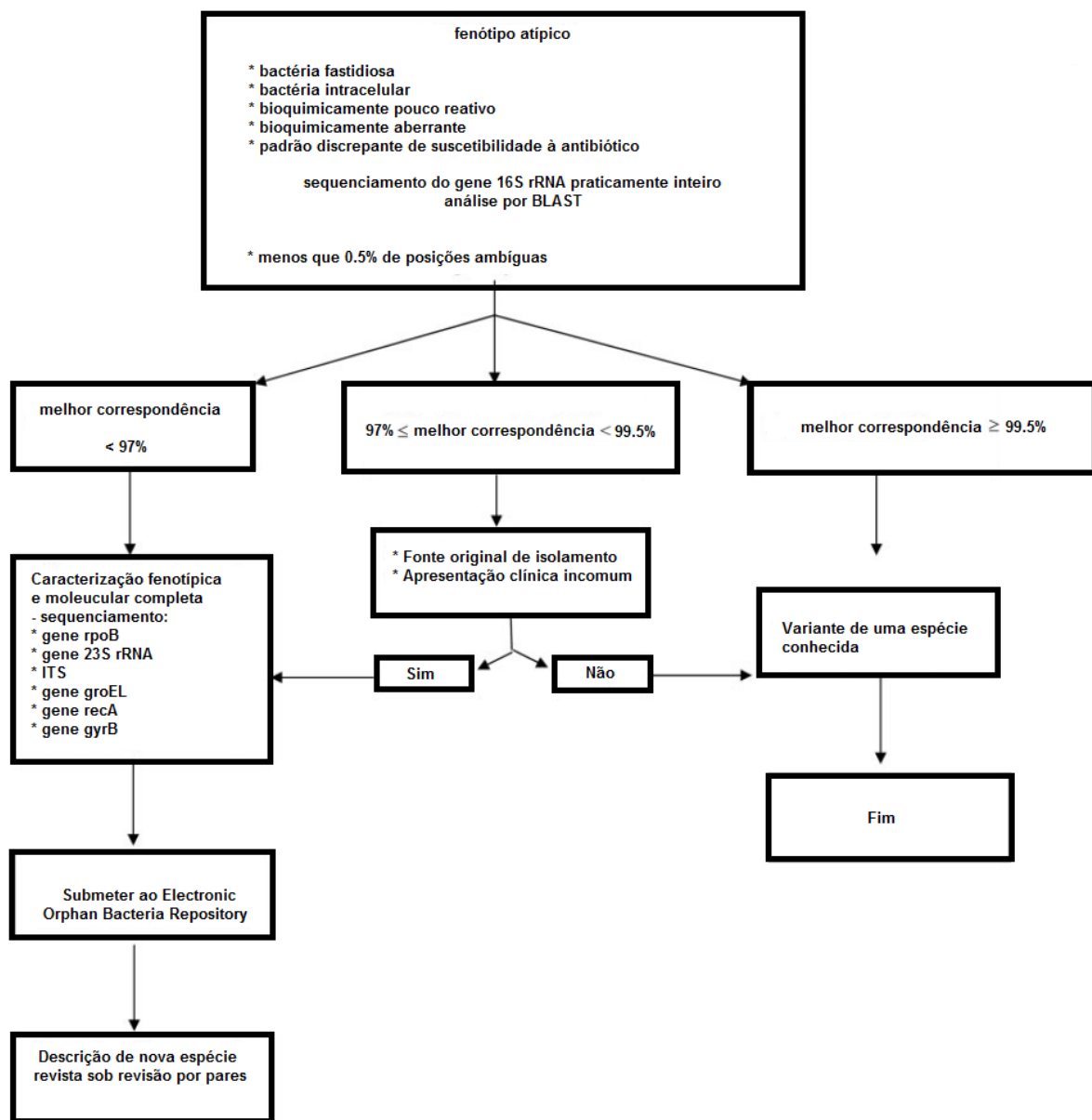


FIGURA 3 – GUIA PROPOSTO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS ESPÉCIES BASEADA EM SEQUÊNCIAS, INICIANDO-SE COM AS SEQUÊNCIAS DO GENE 16S rRNA.  
FONTE: quadro adaptado de Drancourt e Raoult, 2005.



#### 1.1.4 A doença

Caracteristicamente parasitas das hemácias e espoliadores de nutrientes, os hemoplasmas são responsáveis por anemia hemolítica aguda ou doença crônica nos animais infectados. O quadro clínico pode variar de assintomático a até o óbito, dependendo da suscetibilidade do hospedeiro e/ou patogenicidade do hemoplasma (Aguirre et al., 2009). Características de idade, imunossupressão, doenças concomitantes e esplenectomia podem predispor à doença aguda (Messick, 2004). Os sinais clínicos típicos de hemoplasmose com anemia na maioria das espécies hospedeiras, com pequenas variações, incluem letargia, anorexia, palidez de mucosas, pirexia, edema de membros, fraqueza e menor rendimento nos animais de produção e são associados a presença de parasitemia observada nas extensões sanguíneas coradas em lâmina (Stoffregen et al. 2006; Aguirre et al., 2009; Henderson et al., 1997). Na forma crônica da doença, os animais apresentam-se imunocompetentes e aparentemente saudáveis (Messick, 2004). Os hemoparasitas, em geral, não são observados nas extensões sanguíneas coradas, mesmo em animais PCR positivos (Boes et al., não publicado) ou então aparecem transitoriamente em pequeno número, como bem descrito em gatos (Messick, 2003). Cães infectados com *Mycoplasma haemocanis* apresentam-se como portadores latentes do hemoplasma, havendo aparecimento dos sinais clínicos em condições de imunossupressão ou esplenectomia (Brinson e Messick, 2001). O tratamento dos animais é realizado por meio do uso de tetraciclina, porém é provável que mesmo após o tratamento, os animais permaneçam portadores crônicos do parasita (Berent e Messick, 1998; Tornquist et al., 2009).

## 2. HEMOPLASMAS EM RUMINANTES DOMÉSTICOS E SELVAGENS

Os primeiros estudos de hemoplasmas em ruminantes se iniciaram com rebanhos ovinos domésticos (Jolly, 1967; Sutton e Jolly, 1973; Mason et al., 1981; Mason et al., 1989), nos quais foram identificados como *Eperythrozoon ovis*, atualmente renomeado a *Mycoplasma ovis*. Logo, os caprinos domésticos também foram descritos como espécie suscetível à infecção por *M. ovis* (Daddow, 1979a; Mason et al., 1989), e mais recente, relatou-se a infecção de cervídeos pela mesma espécie de hemoplasma (Stoffregen et al., 2006; Watanabe et al., *in press*; Boes et al., não publicado). Camelídeos como lhamas, alpacas e camelos são hospedeiros de '*Candidatus Mycoplasma haemolamae*' (Tornquist et al., 2009; Nazifi et al., 2009; Regan et al., 1990; McLaughlin et al., 1991) e bovinos são hospedeiros de *M. haemobos*, *M. wenyonii*, *Eperythrozoon teganodes*, *E. tuomii* (Tagawa et al., 2009; Meli et al., 2010; Anziani et al., 1982; Uilenberg, 1967).

## 2.1 *Mycoplasma ovís*

A ocorrência de *M. ovís* tem sido descrita em rebanhos ovinos da África do Sul e do Paquistão (Animal Health Yearbook, 1970 *apud* Daddow, 1979b), da Austrália (Mason et al., 1981; Kabay et al., 1991; Mason et al., 1989), da Alemanha (Neimark et al., 2004), Argentina (Aguirre et al., 2009), da Noruega (Brun-Hansen et al., 1997), da Hungria (Hornok et al., 2009), em caprinos da Austrália (Daddow, 1979a; Mason et al., 1989), em bovídeos selvagens do Japão (Ootake et al., *in press*), em cervídeos dos Estados Unidos (Stoffregen et al., 2006; Boes et al., não publicado) e do Japão (Watanabe et al., *in press*).

### 2.1.1 Prevalência em animais domésticos (ovinos e caprinos)

Em geral, os estudos sobre a infecção natural de ovinos por *M. ovís* está associada a rebanhos nos quais houve surto da doença e mortes de alguns animais (Brun-Hansen et al., 1997, Aguirre et al., 2009; Hornok et al., 2009; Mason et al., 1981). Na Noruega, após o diagnóstico de *M. ovís* em um ovino cronicamente infectado, o rebanho foi monitorado durante 4 anos, encontrando-se soroprevalência de 58-100% (24-26/60-70), entretanto, nenhum dos animais apresentava sinais clínicos de infecção (Brun-Hansen et al., 1997). Do mesmo modo, após uma taxa de 6,7% (60/900) de mortalidade associado com sinais clínicos como palidez de mucosas, redução do peso e haemoglobinúria em um plantel da Austrália, a pesquisa sorológica de 10 animais selecionados aleatoriamente revelou que 8 (88,8%) eram positivos para *M. ovís* (Mason et al., 1981).

Em 2004, Neimark e colaboradores, desenvolveram uma técnica de PCR convencional para o diagnóstico de *M. ovís*, caracterizaram e descreveram o hemoplasma ovino obtido a partir da amostra de sangue total de uma ovelha na Alemanha. A sequência encontrada está disponível sob número de acesso no GenBank AF338268. O protocolo desenvolvido de PCR para *M. ovís* e a sequência descrita por Neimark et al. (2004), tornaram-se referência para o diagnóstico e caracterização do hemoplasma.

Na Argentina, dos 11 ovinos necropsiados após surto de doença, 81,8% (9/11) foram positivos para *M. ovís* na PCR (Aguirre et al., 2009). E na Hungria, após surtos de doenças seguidos de mortalidade ovina, a pesquisa e caracterização molecular do agente revelou que 52% (17/33) dos ovinos do rebanho eram positivos para hemoplasmas, encontrando-se sequências com 99,4-99,8% de identidade ao *M. ovís* (AF338268) e uma linhagem variante com deleções na sequência, apresentando apenas 96,8-97,9% de identidade. Concomitantemente 72% (24/33) animais foram positivos para *Anaplasma ovís*.

Na Austrália, estudo sorológico para *M. ovís* mostrou considerável diferença de prevalência entre rebanhos caprinos e ovinos das mesmas regiões. Enquanto 44,9%

(550/1.224) dos ovinos foram soropositivos, apenas 0,17% (1/600) dos caprinos apresentaram títulos (Mason et al., 1989). Estudos de infecção experimental e natural por *M. ovis* em caprinos mostraram que os períodos de parasitemia e mesmo dos títulos de anticorpos circulantes são mais curtos quando comparados aos de ovinos infectados. Além disso, esta parasitemia não se apresenta tão intensa como nos ovinos (Daddow, 1979b). Provavelmente esta espécie hospedeira comporta-se predominantemente como portador crônico e silencioso da bactéria.

#### 2.1.2 Prevalência em animais selvagens (caprinos e cervídeos)

*M. ovis* foi encontrado por *real-time* PCR, PCR convencional e confirmado por sequenciamento nas amostras de sangue total de caprinos selvagens (serow japonês, *Capricornis crispus*) de vida livre do Japão. Embora sem avaliação clínica da infecção, 26,3% (5/19) dos animais apresentavam-se infectados (Ootake et al., *in press*). Em cervídeos, o *M. ovis*, assim como linhagens variantes do hemoparasita ovino e novas espécies têm sido identificadas (Stoffregen et al. 2006; Boes et al, não publicado; Watanabe et al. *in press*). A primeira descrição foi realizada em um plantel de renas (*Rangifer tarandus*) com sinais clínicos de infecção provenientes de um parque nacional dos EUA (Stoffregen et al., 2006). Das 19 renas, 9 (47,3%) foram positivas para hemoplasmas por PCR convencional. Após o sequenciamento de um pequeno fragmento de 6 amostras positivas e filogenia, encontraram-se 2 sequências proximamente relacionadas ao *M. ovis*, 4 ao *M. wenyonni* e outras 2 ao grupo *M. haemofelis* e *M. haemocanis*. No Laboratório de Mycoplasmas Hemotrópicos na Universidade de Purdue, após atendimento clínico de um filhote de veado da cauda branca (*Odocoileus virginianus*) com quadro clínico de anemia grave, Boes e colaboradores (não publicado), suspeitaram de infecção por hemoplasmas e detectaram por meio de PCR convencional e sequenciamento uma linhagem variante do *M. ovis*, denominada *M. ovis-like* clone of Deer Fawn. Os demais animais do plantel (fêmeas adultas), embora sem quadro clínico de infecção por hemoplasmas, foram introduzidas no estudo e 7/8 fêmeas foram positivas para *M. ovis*. Em cervídeos de vida livre, o *M. ovis* tem sido detectado por *real-time* PCR e duas novas espécies de hemoplasmas tem sido propostas (Watanabe et al., *in press*). De 147 veados sika japoneses (*Cervus nippon*), 13 (9%) foram positivos para hemoplasmas e após sequenciamento de um fragmento dos genes 16S rRNA e RNase P e filogenia, foram identificados *M. ovis* e as espécies propostas '*Candidatus M. haemocervae*' e '*Candidatus M. erythroceruae*'.

#### 2.1.3 Apresentação clínica dos animais infectados por *M. ovis*

A infecção por *M. ovis* é geralmente assintomática, porém há descrito relatos de curso agudo e crônico.

Os sinais clínicos da infecção aguda em ovinos incluem o aparecimento de membranas mucosas ictéricas ou pálidas devido à anemia hemolítica. Febre, depressão, perda de peso, redução da tolerância ao exercício e morte também são observados (Brun-Hansen et al., 1997; Aguirre et al., 2009). A severidade da infecção pode variar de acordo com a linhagem do *M. ovis* (Aguirre et al., 2009) e em alguns casos a doença surge na forma de surtos que se estendem de 14 a 28 dias no rebanho. A anemia é frequentemente menos grave em ovinos com alimentação de boa qualidade e sem uma alta carga de parasitas. A doença é pronunciada em cordeiros, borregos e em ovelhas gestantes que não recebem um bom manejo nutricional (Gullard et al., 1987). A transmissão da doença está relacionada ao contato com sangue de animal infectado de modo direto ou indireto. Carrapatos (*Haemaphysalis plumbeum* e o *Rhipicephalus bursa*) e mosquitos (*Aedes camptorhynchus* e o *Culex annulirostris*) têm sido implicados na transmissão de hemoplasmas (Neimark et al., 2004), assim como atividades de manejo, de vacinação, tosquia e brincagem (Brun-Hansen et al. 1997).

A forma crônica se caracteriza por anemia moderada, fadiga e redução do rendimento (produção de carne e lã) (Daddow, 1979c). Poucos parasitas são observados no sangue periférico dos animais infectados. A anemia pode ser acentuada devido ao estresse, imunossupressão ou doenças concomitantes (Messick, 2004). Os ovinos se mantêm infectados pelo hemoplasma durante longos períodos (Daddow, 1981; Brun-Hansen et al., 1997) mesmo após o tratamento com antibióticos eficazes (Messick, 2004; Neimark et al., 2004).

Nos cervídeos ambas as apresentações clínicas, aguda e crônica, tem sido observadas de forma similar aos quadros presentes em ovinos (Stoffregen et al., 2006; Boes et al, não publicado). Entretanto, a epidemiologia e patologia do agente infeccioso nestes animais precisa ser melhor esclarecida.

## 2.2 ‘*Candidatus Mycoplasma haemolamae*’

O primeiro trabalho a identificar hemoplasmas em camelídeos foi realizado por McLaughlin e colaboradores em 1990 descrevendo a presença de ‘*Eperythrozoon-like organisms*’ em lhamas (*Lama glama*) dos EUA por meio dos sinais clínicos apresentados pelos animais, pelo teste de hemaglutinação indireta e pelas características do parasita na microscopia ótica e eletrônica. Outros trabalhos identificaram o parasita em lhamas de outras regiões dos EUA (Reagan et al., 1990) e no Peru (Tornquist et al., 2010), em camelos (*Camelus dromedarius*) do Irã (Nazifi et al., 2009), da Suíça (Meli et al., 2010; Kaufmann et al., 2010) e em alpacas (*Lama pacos*) do Peru e do Chile (Tornquist et al., 2010) e da Suíça (Meli et al., 2010).

### 2.2.1 Prevalência

Os estudos da infecção por '*Candidatus Mycoplasma haemolamae*' concentram-se em descrições de casos isolados e acompanhamento de terapia antibiótica, sendo escassos os trabalhos de prevalência nos rebanhos ou nos animais de vida livre. Recentemente, dois estudos apresentaram a prevalência da infecção em alpacas e lhamas diagnosticadas por PCR convencional (Tornquist et al., 2010; Meli et al., 2010) e pelo PCR quantitativo (Meli et al., 2010). De um rebanho de 140 animais entre alpacas e lhamas importadas e nativas da Suíça a pesquisa de hemoplasma em animais selecionados mostrou que 45,8% (11/24) das alpacas apresentavam-se infectadas por '*Candidatus Mycoplasma haemolamae*', enquanto as lhamas estudadas (0/2) estavam livres da infecção (Meli et al., 2010). No Peru e no Chile, rebanhos de alpacas e lhamas dos dois países foram estudados, encontrando-se entre alpacas e lhamas peruanas 19,3% (41/212) e 15,7% (12/76) de prevalência de infecção, e 9,26% (10/108) das alpacas chilenas infectadas. Em ambos os estudos, observou-se que a maioria dos animais infectados apresentam-se assintomáticos.

### 2.2.2 Apresentação clínica dos animais infectados por '*Candidatus Mycoplasma haemolamae*'

Lhamas e alpacas infectadas com '*Candidatus Mycoplasma haemolamae*' podem apresentar anemia branda ou grave. Sinais clínicos como letargia, depressão, febre, icterícia e redução do peso podem acompanhar a anemia presente nos camelídeos infectados. Entretanto, parece que a maioria dos animais não apresenta qualquer anormalidade clínica ou laboratorial associada com a infecção (Reagan et al., 1990). A doença clínica e mesmo a morte podem ocorrer quando os animais estão imunossuprimidos, estressados ou apresentam-se co-infectados com outros organismos, como parasitas gastro-intestinais.

## 2.3 *Mycoplasma wenyonni* e '*Candidatus Mycoplasma haemobos*'

### 2.3.1 Prevalência

A eperythrozoonose bovina é relacionada ao *Eperythrozoon wenyonni* (atualmente reclassificado como *M. wenyonni*) e à nova espécie descrita, '*Candidatus Mycoplasma haemobos*'. Muitas vezes os dois agentes são encontrados co-infectando os animais. Recentes trabalhos de diagnóstico molecular e caracterização dos hemoplasmas tem encontrado as seguintes prevalências: Tagawa e colaboradores (2010) identificaram no Japão que 22,3% (23/103) dos bovinos saudáveis de uma fazenda foram hemoplasmas positivos (sendo 60,8%

destes animais infectados por *M. wenyonii*, 30,4% por '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' e os 8,6% restantes co-infectados). Em 2008, o mesmo grupo já havia estudado a prevalência da infecção pelos dois hemoplasmas bovinos nos animais atendidos em um hospital veterinário japonês, encontrando entre os animais doentes, as prevalências de 21,8% (17/78) dos animais infectados por *M. wenyonii*, 16,7% (13/78) por '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' e 5,1% (4/78) co-infectados (Tagawa et al., 2008). Outros trabalhos têm revelado a presença de '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' em surtos de doença em rebanhos bovinos (50% ou 10/20 dos animais infectados) na Alemanha (Hoezle et al., 2010) e em rebanhos de bovinos (41,5% ou 5/12 animais de corte e 14,3% ou 6/42 vacas de leite) e de bubalinos (32% ou 8/25 búfalos) na China (Su et al., 2010). Na Suíça, Meli e colaboradores (2010) desenvolveram a técnica de PCR quantitativa específica para os hemoplasmas bovinos e encontraram a presença de infecção pelos dois hemoplasmas bovinos em todos os grupos estudados envolvendo: bovinos adultos clinicamente doentes (61,4% ou 35/57), clinicamente sadios (72,1% ou 44/61), terneiros (6,4% ou 3/47) e um grupo de bovinos proveniente de um rebanho com surto de anaplasmoze (91,8% ou 146/159).

### 2.3.2 Apresentação clínica dos animais infectados por *M. wenyonii* e '*Candidatus Mycoplasma haemobos*'

Os sinais clínicos da doença em bovinos caracteriza-se pela presença de febre transitória, linfadenopatia, anorexia, perda de peso, decréscimo da produção de leite, entretanto em muitos animais a infecção permanece inaparente. Em casos crônicos de infecção por *M. wenyonii* tem sido relatada a ocorrência de edema escrotal e dos membros pélvicos em touros, enquanto nas vacas de produção leiteira observou-se a presença de edema dos tetos e distalmente nos membros posteriores, febre transitória, linfadenopatia na região femural, pelagem áspera, redução do peso e da produção leiteira, assim como infertilidade (Tagawa et al. 2010).

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE, D.H., THOMPSON, C., NEUMANN, R.D., SALATIN, A.O., GAIDO, A.B., DE ECHAIDE, S.T. 2009. Clinical mycoplasmosis outbreak due to *Mycoplasma ovis* in sheep from Shalta, Argentina. Clinical, microbiological and molecular diagnosis. Rev. Argent. Microbiol. 41:212-214.
- ALMY, F.S., LADD, S.M., SPONENBERG, D.P., CRISMAN, M.V., MESSICK, J.B. 2006. *Mycoplasma haemolamae* infection in a 4-day-old cria: Support for in utero transmission by use of a polymerase chain reaction assay. Can. Vet. J. 47:229–233.
- ANZIANI, O.S., TARABLA, H.D., FORD, C.A. 1982. *Eperythrozoon teganodes* infection in splenectomized calves in the province of Santa Fe, Argentina. Rev. Argent. Microbiol. 14:37-40.
- BARTLETT, L.R., PEASE, P.E. 1975. Latent *Haemobartonella muris* infection: its transmission and decline in an inbred, ectoparasite-free strain of Wistar rat. Parasitology 71: 35-40.
- BERENT, L.M., MESSICK, J.B. 2003. Physical map and genome sequencing survey of *Mycoplasma haemofelis* (*Haemobartonella felis*). Infect. Immun. 71:3657-3662.
- BERENT, L.M., MESSICK, J.B., COOPER, S.K. 1998. Detection of *Haemobartonella felis* in cats with experimentally induced acute and chronic infection, using a polymerase chain reaction assay. Am. J. Vet. Res. 59:1215-1220.
- BERRIER, H.H., GOUGE, R.E. 1954. Eperythrozoonosis transmitted in utero from carrier sows to their pigs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 124:98-100.
- BIDWELL, D.E., VOLLER, A. 1967. The effect of *Eperythrozoon coccoides* on infections in mice [abstract]. Parasitology 57:22.
- BOLEN, E.G., ROBINSON, W.L. 2003. Wildlife Ecology and Management. 5ª ed. Person Benjamin Cummings. San Francisco:EUA. 613p.
- BRINSON, J. J., MESSICK, J. B. 2001. Use of a polymerase chain reaction assay for detection of *Haemobartonella canis* in a dog. J. Am. Vet. Med. Assoc. 218:1943–1945.

- BRUN-HANSEN, H., GRONSTOL, H., WALDELAND, H., HOFF, B. 1997. *Eperythrozoon ovis* infection in a Commercial Flock of Sheep. J. Vet. Med. B. 44: 295-299.
- CHEN, K., NEIMARK, H., RUMORE, P., STEINMAN, C.R. 1989. Broad-range DNA probes for detecting and amplifying eubacterial nucleic acids. FEMS Microbiol. Lett. 57:19–24.
- CLARRIDGE, J.E. 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Clin. Microb. Rev. 840–862.
- DADDOW, K.N. 1979. (a) The natural occurrence in a goat of an organism resembling *Eperythrozoon ovis*. Aust. Vet. J. 55.
- \_\_\_\_\_, K.N. 1979. (b) The transmission of a sheep strain of *Eperythrozoon ovis* to goats and development of a carrier state in the goats. Aust. Vet. J. 55:605.
- \_\_\_\_\_, K.N. 1979. (c). *Eperythrozoon ovis* – a cause of anaemia, reduced production and decreased exercise tolerance in sheep. Aust. Vet. J. 55:605-6.
- \_\_\_\_\_, K.N. 1981. The duration of the carrier state of *Eperythrozoon ovis* infection in sheep (letter). Aust. Vet. J. 57: 49.
- DEEM, S.L., NOSS, A.J., VILLARROEL, R., UHART, M.M., KARESH, W.B. 2004. Disease survey of free-ranging grey brocket deer (*Mazama gouazoubira*) in Gran Chaco, Bolivia. J. Wild. Dis. 40:92-95.
- DRANCOURT, M., RAOULT, D. 2005. Sequence-Based Identification of New Bacteria: a Proposition for Creation of an Orphan Bacterium Repository. J. Clin. Microb. 4311–4315.
- EWERS, W.H. 1971. *Eperythrozoon mariboi* sp. nov., (Protozoa: order Richettsiales) a parasite of red blood cells of the flying fox *Pteropus macrotis epularius* in New Guinea. Parasitology 63:261-269.
- FERREIRA, R.A., MINEO, J.R., DUARTE, J.M., SILVA, O., PATARROYO, J.H. 1997. Toxoplasmosis in Naturally Infected Deer from Brazil. J. Wild. Dis. 33(4):896-899.
- FRERICHS, W.M., HOLBROOK, A.A. 1971. *Haemobartonella procyni* sp. in the raccoon, *Procyon lotor*. J. Parasitol. 57:1309-1310.



FYUMAGWA, R.D. SIMMLER, P., WILLI, B., MELI, M.L., SUTTER, A., HOARE, R., DASEN, G., HOFMANN-LEHMANN, R., LUTZ, H. 2008. Molecular detection of haemotropic *Mycoplasma* species in *Rhipicephalus sanguineus* tick species collected on lions (*Panthera leo*) from Ngorongoro Crator, Tanzania. South Afri. J. Wild. Res. 38(2):117-122. [abstract].

GULLARD, F.M., DOXEY, D.L., SCOTT, G.R. 1987. The effects of *Eperythrozoon ovis* in sheep. Res. Vet. Sci. 43:88-91.

HACKETT, T.B., JENSEN, W.A., LEHMAN, T.L., HOHENHAUS, A.E., CRAWFORD, P.C., GIGER, U., LAPPIN, M.R. 2006. Prevalence of DNA of *Mycoplasma haemofelis*, 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*,' *Anaplasma phagocytophilum*, and species of *Bartonella*, *Neorickettsia*, and *Ehrlichia* in cats used as blood donors in the United States. Am. J. Vet. Res. 229: 700-5.

HENDERSON, J.P., O'HAGAN, J., HAWES, S.M., PRATT, M.C.H. 1997. Anaemia and low viability in piglets infected with *Eperythrozoon suis*. Vet. Rec. 140:144-146.

HERO, J.M., RIDGWAY, T. Declínio global de espécies. In: Biologia da Conservação, Essências. Rima, São Carlos:SP. 582p. 2006.

HOELZLE, K., ENGELS, M., KRAMER, M.M, WITTENBRINK, M.M, DIECKMANN, S.M., HOELZLE, L.E. 2010. Occurrence of *Mycoplasma suis* in wild boars (*Sus scrofa* L.). Vet. Microb. 143:405–409.

HORNOK, S., MELI, M.L., ERDOS, A., HAJTÓS, I., LUTZ, H., HOFMANN-LEHMANN, R. 2009. Molecular characterization of two different strains of haemotropic mycoplasmas from a sheep flock with fatal haemolytic anaemia and concomitant *Anaplasma ovis* infection. Vet. Microb. 136:372–377.

HU, Z., YIN, J., SHEN, K., KANG, W., CHEN, Q. 2009. Outbreaks of Hemotropic Mycoplasma Infections in China. Emerg. Infect. Dis. 15:1139-1140.

JOLLY, R.D. 1967. *Eperythrozoon* infection in a lamb. Letter to editor. New Zeal. Vet. J. 15:47-48.

KABAY, M.J., RICHARDS, R.B., ELLIS, T.E. 1991. A cross-sectional study to show *Eperythrozoon ovis* infection is prevalent in Western Australian sheep farms. Aust. Vet. J. 68:170-173.

KARSTAD, L. 1971. Disease of wildlife. In: A manual of wildlife conservation. The Wildlife Society, Washington, DC. 206p.

KAUFMANN, C., MELI, M.L., HOFMANN-LEHMANN, R., ZANOLARI, P. 2010. [First detection of "*Candidatus* Mycoplasma haemolamae" in South American Camelids of Switzerland and evaluation of prevalence]. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 123:477-81.

KOLBERT, C.P., PERSING, D.H. 1999. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. Curr. Opin. Microbiol. 2:299–305.

KREIER, J.P., RISTIC, M. 1984. Genus III *Haemobartonella*; genus IV *Eperythrozoon*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1, pp. 724–729. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.

MARTINEZ, A., SALINAS, A., MARTINEZ, F., CANTU, A., MILLER, D.K. 1999. Serosurvey for selected disease agents in white-tailed deer from Mexico. J. Wild. Dis. 35:799-803.

MASON, R.W., MANUEL, M., DADDOW, K.N., WITT, D.J. 1981. *Eperythrozoon ovis* recorded in Tasmania in association with Heinz body development. Letter. Aust. Vet. J. 57:46.

MASON, R.W., CORBOULD, A., STATHAM, P. 1989. A serological survey of *Eperythrozoon ovis* in goats and sheep in Tasmania. Aust. Vet. J. 66.

MATHIAS, L.A., GIRIO, R.J.S., DUARTE, J.M.B. 1999. Serosurvey for antibodies against *Brucella abortus* and *Leptospira interrogans* in Pampas deer from Brazil. J. Wild. Dis. 35:112-114.

MCLAUGHLIN, B.G., EVANS, C.N., MCLAUGHLIN, P.S. 1990. An *Eperythrozoon*-like parasite in llamas. J. Am. Vet. Med. Assoc. 197:1170-1175.

MCLAUGHLIN, B.G., MCLAUGHLIN, P.S., EVANS, C.N. 1991. An Eperythrozoon-like parasite of llamas: attempted transmission to swine, sheep, and cats. J. Vet. Diagn. Invest. 3:352-353.

MELI, M.L., WILLI, B., DREHER, U.B., CATTORI, V., KNUBBEN-SCHWEIZER, G., NUSS, K., BRAUN, U., LUTZ, H., HOFMANN-LEHMANN, R. 2010. Identification, Molecular Characterization, and Occurrence of Two Bovine Hemoplasma Species in Swiss Cattle and Development of Real-Time TaqMan Quantitative PCR Assays for Diagnosis of Bovine Hemoplasma Infections. J. Clin. Microb. 48:3563–3568.

MESSICK, J.B. 2003. New perspectives about hemotropic mycoplasma (formerly, *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* species) infections in dogs and cats. Vet. Clin. Small Anim. 33:1453–1465.

\_\_\_\_\_, J.B. 2004. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. Vet. Clin. Pathol. 33:2-13.

MESSICK, J.B., BERENT, L., EHRHART, E.J., WASMER, C.C. 2000. Light and electron microscopic features of *Eperythrozoon*-like parasites in a North American opossum (*Didelphis virginiana*). J. Zoo Wild. Med. 31:240-243.

MESSICK, J.B., WALKER, P.G., RAPHEL, W., BERENT, L., SHI, X. 2002. ‘*Candidatus* Mycoplasma haemodidelphis’ sp. nov., ‘*Candidatus* Mycoplasma haemolamae’ sp. nov. and *Mycoplasma haemocanis* comb. nov., haemotropic parasites from a naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*), alpaca (*Lama pacos*) and dog (*Canis familiaris*): phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasmas. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52:689-693.

MILES, R.J. 1992. Cell nutrition and growth. In: Maniloff J, McElhaney RN, Finch LR, Baseman JB, eds. Mycoplasmas: molecular Biology and Pathogenesis. Washington, DC: American Society for Microbiology. p23-40.

MURRAY, D.L., KAPKE, C.A., EVERMANN, J.F., FULLER, T.K. 1999. Infectious diseases and conservation of free-ranging large carnivores. Ani. Conservation 2:241-254.

NAZIFI, S., ORYAN, A., BAHRAMI, S., RAZAVI, S.M. 2009. Evaluation of haematological and serum biochemical parameters in Iranian camels (*Camelus dromedarius*) infected with haemotropic mycoplasma (*Eperythrozoon*) spp. Comp. Clin. Pathol. 18:329–332.

NEIMARK, H., KOCAN, K.M. 1997. The cell wall-less rickettsia *Eperythrozoon wenyonii* is a Mycoplasma. FEMS Microbiol Lett. 156:287-91.

NEIMARK, H., JOHANSSON, K., RIKIHISA, Y., TULLY, J.G. 2001. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of 'Candidatus *Mycoplasma haemofelis*', 'Candidatus *Mycoplasma haemomuris*', 'Candidatus *Mycoplasma haemosuis*' and 'Candidatus *Mycoplasma wenyonii*'. Intl. J. Syst. Evol. Microb. 51:891–899.

NEIMARK, H., BARNAUD, A., GOUNON, P., MICHEL, J.C., CONTAMIN, H. 2002a. The putative haemobartonella that influences *Plasmodium falciparum* parasitaemia in squirrel monkeys is a haemotrophic mycoplasma. Microbes Infect. 4:693-698.

NEIMARK, H., JOHANSSON, K., RIKIHISA, Y., TULLY, J.G. 2002b. Revision of haemotrophic *Mycoplasma* species names. Intl. J. Syst. Evol. Microb. 52:683.

NEIMARK, H., HOFF, B., GANTER, M. 2004. *Mycoplasma ovis* comb. nov. (formerly *Eperythrozoon ovis*), an eperythrocyclic agent of haemolytic anaemia in sheep and goats. Intl. J. Syst. Evol. Microb. 54:365–371.

PALYS, T., NAKAMURA, L.K., COHAN, F. M. 1997. Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. Int. J. Syst. Bacteriol. 47:1145–1156.

PETERS, I.R., HELPS, C.R., MCAULIFFE, L., NEIMARK, H., LAPPIN, M.R., GRUFFYDD-JONES, T.J., DAY, M.J., HOELZLE, L.E., WILLI, B., MELI, M., HOFMANN-LEHMANN, R., TASKER, S. 2008. RNase P Gene (*rnpB*) Phylogeny of Hemoplasmas and Other *Mycoplasma* Species. J. Clin. Microb. p1873–1877.

PORTIANSKY E.L., QUIROGA, M.A., MACHUCA, M.A., PERFUMO, C.J. 2004. *Mycoplasma suis* in naturally infected pigs: an ultrastructural and morphometric study. Pesq. Vet. Bras. 24:1-5.

RAZIN, S. 1992. Peculiar properties of mycoplasmas: the smallest self-replicating prokaryotes. FEMS Microbiol. Letter. 100:423-432.

RAZIN, S., YOGEV, D., NAOT, Y. 1998. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. Microb. Mol. Biol. Rev., 62:1094–1156.

- REAGAN, W.J., GARRY, F., THRALL, M.A., COLGAN, S., HUTCHISON, J., WEISER, M.G. 1990. The Clinicopathologic, Light, and Scanning Electron Microscopic Features of Eperythrozoonosis in Four Naturally Infected Llamas. *Vet Pathol* 27:426-431.
- RELMAN, D. A. 1999. The search for unrecognized pathogens. *Science* 284:1308–1310.
- RIKIHISA, Y., KAWAHARA, M., WEN, B., KOCIBA, G., FUERST, P., KAWAMORI, F., SUTO, C., SHIBATA, S., FUTOHASHI, M. 1997. Western Immunoblot Analysis of *Haemobartonella muris* and Comparison of 16S rRNA Gene Sequences of *H. muris*, *H. felis*, and *Eperythrozoon suis*. *J. Clin. Microb.* p823–829.
- ROURA, X., PETERS, I.R., ALTET, L., TABAR, M., BARKER, E.N., PLANELLAS, M., HELPS, C.R., FRANCINO, O., SHAW, S.E., TASKER, S. 2010. Prevalence of hemotropic mycoplasmas in healthy and unhealthy cats and dogs in Spain. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22:270–274.
- SANTOS, A.P., MESSICK, J.B., BIONDO, A.W., OLIVEIRA, S.T., PEDRALLI, V., LASTA, C.S., LACERDA, L.A., ESTEVES, V.S., HOFMANN-LEHMANN, R., WILLI, B., GONZÁLEZ, F.H.D. 2009. Design, optimization, and application of a conventional PCR assay with an internal control for detection of ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ 16S rDNA in domestic cats from Brazil. *Vet. Clin. Pathol.* 1–10.
- SANTOS, A.P., SANTOS, R.P., BIONDO, A.W., DORA, J.M., GOLDANI, L.Z., OLIVEIRA, S.T., GUIMARAES, A.M.S., TIMENETSKY, J., MORAIS, H.A., GONZALES, F.H.D., MESSICK, J.B. 2008. Hemoplasma Infection in HIV-positive Patient, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 14:1922-1924.
- STOFFREGEN, W.C., ALT, D.P., PALMER, M.V., OLSEN, S.C., WATERS, W.R., STASKO, J.A. 2006. Identification of a *Haemomycoplasma* Species in anemic reindeer (*Rangifer Tarandus*) *J. Wild. Dis.* 42:249-258.
- SU, Q.L., SONG, H.Q., LIN, R.Q., YUAN, Z.G., YANG, J.F., ZHAO, G.H., HUANG, W.Y., ZHU, X.Q. 2010. The detection of “*Candidatus Mycoplasma haemobos*” in cattle and buffalo in China. *Trop. Anim. Health Prod.* 42:1805–1808.
- SUTTON, R.H., JOLLY, R.D. 1973. Experimental *Eperythrozoon ovis* infection in sheep. *New Zeal. Vet. J.* 21:160-163.
- SUTTON, R.H. 1970. *Eperythrozoon ovis* – a blood parasite of the sheep. *New Zeal. Vet. J.* 18:156-164.

SYKES, J.E., LINDSAY, L.L., MAGGI, R.G., BREITSCHWERDT, E.B. 2010. Human co-infection with *Bartonella henselae* and two hemotropic mycoplasma variants resembling *Mycoplasma ovis*. J. Clin. Microbiol. 48:3782-3785.

TAGAWA, M., MATSUMOTO, K., INOKUMA, H. 2008. Molecular detection of *Mycoplasma wenyonii* and 'Candidatus Mycoplasma haemobos' in cattle in Hokkaido, Japan. Vet. Microb. 132:177–180.

TAGAWA, M., MATSUMOTO, K., YOKOYAMA, N., INOKUMA, H. 2010. Comparison of the Effect of Two Hemoplasma Species on Hematological Parameters in Cattle. J. Vet. Med. Sci. 72:113–115.

TAROURA, S., SHIMADA, Y., SAKATA, Y., MIYAMA, T., HIRAOKA, H., WATANABE, M., ITAMOTO, K., OKUDA, M., INOKUMA, H. 2005. Detection of DNA of 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' and *Spiroplasma* sp. in unfed ticks collected from vegetation in Japan. J. Vet. Med. Sci. 67(12):1277-1279.

TASKER, S., HELPS, C.R., DAY, M.J., HARBOUR, D.A., SHAW, S.E., HARRUS, S., BANETH, G., LOBETTI, R.G., MALIK, R., BEAUFILS, J.P., BELFORD, C.R., GRUFFYDD-JONES, T.J. 2003. Phylogenetic Analysis of Hemoplasma Species: an International Study. J. Clin. Microb. p 3877–3880.

TEXAS AGRICULTURAL EXTENSION SERVICE. 1914. Controlling Bovine Tuberculosis and Other Infectious Diseases in Captive Deer with Total Health Management. Floron C. Faries and Donald S. Davis. Acts of Congress of May.

TORNQUIST, S.J., BOEDER, L., RIOS-PHILLIPS, C., ALARCON, V. 2010. Prevalence of *Mycoplasma haemolamae* infection in Peruvian and Chilean llamas and alpacas. J. Vet. Diagn. Invest. 22:766–769.

TORNQUIST, S.J., BOEDER, L.J., CEBRA, C.K., MESSICK, J. 2009. Use of a polymerase chain reaction assay to study response to oxytetracycline treatment in experimental 'Candidatus Mycoplasma haemolamae' infection in alpacas. Am. J. Vet. Res. 70:1102-7.

TRAINER, D.O. 1970. The use of wildlife to monitor zoonoses. Journal of Wildlife Diseases. 6:397-401.

TRAINER, D.O., HANSON, R.P. 1969. Serologic evidence of arbovirus infections in wild ruminants. *American Journal Epidemiology*, 90:354-358.

TULLY, J.G., BOVE, J.M., LAIGRET, F., WHISCOMB, R.F. 1993. Revised taxonomy of the class Mollicutes: proposed elevation of a monophyletic cluster of arthropod-associated mollicutes to the ordinal rank (Entomoplasmatales ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (Entoplasmataceae fam. nov.) from helical species (Spiroplasmataceae), and emended descriptions of the order Mycoplasmatales, family Mycoplasmataceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:378-385.

UILENBERG, G. 1967. *Eperythrozoon tuomii*, n.sp. (Rickettsiales), the 3rd species of *Eperythrozoon* of cattle in Madagascar. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays. Trop.* 20:563-569.

UILENBERG, G., ZEEUWEN, A.A., DE RUIJTER, T. 1981. *Eperythrozoon parvum* (Rickettsiales) in swine in the Netherlands. *Tijdschr Diergeneeskd.* 106:456.

VIEIRA, R.F.C., MOLENTO, M.B., SANTOS, L.C., MORAES, W., CUBAS, Z.S., SANTOS, A.P., GUIMARAES, A.M.S., MOHAMED, A., FILHO, I.R.B., BIONDO, A.W., MESSICK, J.B. 2009. Detection of a novel hemoplasma based on 16S rRNA gene DNA in captive and free-ranging capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*). *Vet. Microbiol.* 139:410-3.

WILLI, B., BORETTI, F.S., BAUMGARTNER, C., TASKER, S., WENGER, S., CATTORI, V., MELI, M.L., REUSCH, C.E., LUTZ, H., HOFMANN-LEHMANN, R. 2006. Prevalence, Risk Factor Analysis, and Follow-Up of Infections Caused by Three Feline Hemoplasma Species in Cats in Switzerland. *J. Clin. Microb.* p.961–969.

WILLI, B., FILONI, C., CATÃO-DIAS, J.L., CATTORI, V., MELI, M.L., VARGAS, A., MARTÍNEZ, F., ROELKE, M.E., RYSER-DEGIORGIS, M.P., LEUTENEGGER, C.M., LUTZ, H., HOFMANN-LEHMANN, R. 2007. Worldwide occurrence of feline hemoplasma infections in wild felid species. *J. Clin. Microbiol.* 45:1159-66.

WOESE, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221-271.

WOODS, J.E., WISNEWSKI, N., LAPPIN, M.R. 2006. Attempted transmission of ‘*Candidatus* *Mycoplasma haemominutum*’ and *Mycoplasma haemofelis* by feeding cats infected *Ctenocephalides felis*. *Am. J. Vet. Res.* 67:494-7.

YUAN, C.L., LIANG, A.B., YAO, C.B., YANG, Z.B., ZHU, J.G., CUI, L., YU, F., ZHU, N.Y., YANG, X.W., XIU, M.S., HUA, G. 2009. Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection in swine and swine-farm workers in Shanghai, China. Am. J. Vet. Res. 70:890–894.

YANG, D., TAI, X., QIU, Y. YUN, S. 2000. Prevalence of *Eperythrozoon* spp. Infection and Congenital Eperythrozoonosis in Humans in Inner Mongolia, China. Epidemiol. and Infect. 125:421-426.



## Capítulo 2 – HEMOPLASMAS EM CERVÍDEOS DE CATIVEIRO DO REFÚGIO BIOLÓGICO BELA VISTA: FILOGENIA, PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO PARA A INFECÇÃO

Formatado conforme as “Instruções para autores” da revista Veterinary Microbiology

### RESUMO

Mycoplasmas hemotrópicos (hemoplasmas) são bactérias com a capacidade de infectar os eritrócitos de mamíferos, levando à doença clínica nos animais infectados. Tem sido sugerido que o *Mycoplasma ovis*, hemoplasma que infecta ovinos e caprinos, possa também infectar cervídeos. Este estudo teve por objetivos 1) determinar a prevalência da infecção por micoplasmas hemotrópicos em cervídeos Sul Americanos mantidos em cativeiro; 2) realizar a análise filogenética dos isolados encontrados e, 3) avaliar os fatores de risco e as alterações hematológicas associadas à infecção. Amostras de sangue total de 32 cervídeos Sul Americanos de cativeiro foram coletadas. Realizou-se a avaliação dos parâmetros hematológicos, microscopia ótica e eletrônica, seguindo-se a extração de DNA das amostras, PCR dos genes 16S e 23S rRNA de hemoplasmas e sequenciamento. De 31 animais, 27 (87%) foram positivos para *M. ovis*, incluindo 21/22 *Mazama nana*, 2/3 *Mazama americana* e 4/6 *Blastocerus dichotomus*. Das 27 amostras positivas sequenciadas para o gene 16S rRNA, 26 apresentaram 98,2-98,8% de identidade ao *M. ovis* identificado em ovinos (GenBank, AF338268) e 98,6-99,4% de identidade ao *M. ovis*-like identificado em cervídeos (FJ824847); para o gene 23S rRNA foi encontrada identidade de 97,7% entre um desses isolados e o *M. ovis*-like. Um isolado apresentou apenas 95,1% de identidade ao gene 16S rRNA do *M. ovis* (AF338268) e somente 89,4% de identidade ao gene 23S rRNA do *M. ovis*-like. Os fatores de risco (espécie, sexo, idade, procedência e presença de carrapatos) assim como a presença de alterações hematológicas não foram associadas com a infecção por hemoplasma na população estudada ( $P > 0.05$ ). Entretanto, os dados clínicos e moleculares sugerem que o isolado divergente seja uma nova espécie de hemoplasma infectando os cervídeos e possivelmente mais patogênica.

Palavras-chave: *Mycoplasma ovis*, cervídeos, 23S rDNA, cativeiro, animais silvestres, hemoplasma.

## ABSTRACT

Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) are bacteria that attach to red blood cells of mammals, leading to clinical disease in infected animals. It has been suggested that *Mycoplasma ovis*, a hemoplasma that infects sheep and goats worldwide, may also infect deer. The aim of this study was to 1) determine the prevalence of hemotrophic mycoplasmas in captive South American cervids maintained at a wildlife sanctuary; 2) perform phylogenetic analysis of hemoplasma isolates; and 3) evaluate the correlation between presence of hemoplasma and hematological abnormalities and potential risk factors. EDTA anticoagulated blood samples from a herd of 32 captive South American deer were collected. Hematologic parameters were evaluated followed by light and electronic microscopy, DNA extraction, PCR amplification of 16S and 23S rRNA genes, and sequencing of products. By *M. ovis* PCR, 27/31 (87%) were positive, including 21/22 *Mazama nana*; 2/3 *Mazama americana* and 4/6 *Blastocerus dichotomus*. Sequencing of the nearly entire 16S rRNA gene of 26/27 positive samples showed 98.2-98.8% identity to *M. ovis* of sheep (GenBank, AF338268) and 98.6-99.4% identity to *M. ovis*-like of a fawn (FJ824847); the 23S rRNA genes from one of these isolates and the fawn's had 97.7% identity. The remaining isolate had just 95.1% identity to 16S rRNA gene of *M. ovis* (AF338268) and only 89.4% identity to the 23S rRNA gene of the fawn's *M. ovis*. Potential risk factors (species, gender, age, animal origin and presence of ticks) as well as the presence of hematologic abnormalities were not associated with hemoplasma infection in the studied deer population ( $P > 0.05$ ). However, clinical and molecular data suggest that the divergent isolate is a novel, possibly more pathogenic, hemoplasma species infecting deer.

Keywords: *Mycoplasma ovis*, deer, 23S rDNA, captive, wild animals, hemoplasma.

## 1. INTRODUÇÃO

Micoplasmas hemotrópicos (hemoplasmas) são bactérias de tamanho reduzido, não cultiváveis e desprovidas de parede celular que parasitam os eritrócitos de várias espécies de mamíferos (Messick, 2004). Previamente pertencentes a dois gêneros (*Haemobartonella* e *Eperythrozoon*) dentro da família Anaplasmataceae, os hemoplasmas foram reclassificados para o gênero *Mycoplasma* a partir da análise das sequências do gene 16S rRNA (Neimark et al., 2001). Dentre este novo grupo, o *Mycoplasma ovis* (anteriormente conhecido como *Eperythrozoon ovis*) foi descrito em ruminantes domésticos (ovinos e caprinos), responsável pelo aparecimento de um quadro de anemia brando a grave, redução do peso e alta mortalidade em animais jovens (Philbey et al., 2006). Já animais adultos mais comumente desenvolvem a infecção crônica na ausência de sinais clínicos (Daddow, 1981) e podem atuar como fonte de infecção para outros animais no rebanho (Mason e Staham, 1991). Embora as vias naturais de transmissão da bactéria não estejam bem definidas, os carrapatos (Nikol'skii e Splipchenko, 1969) e os mosquitos (Daddow, 1980) são implicados como vetores de hemoplasmas para os hospedeiros vertebrados.

Embora ovinos e caprinos sejam considerados os principais hospedeiros para *M. ovis*, o ciclo epidemiológico da bactéria relacionado aos ruminantes selvagens precisa ser esclarecido. Por meio da técnica de PCR, *M. ovis* foi recentemente detectado em veado da cauda branca (Boes et al, não publicado) e alces (Stoffregen et al., 2006). Alguns cervídeos apresentaram sinais agudos de infecção juntamente com a observação da bactéria nas extensões sanguíneas coradas, enquanto outros animais infectados apresentavam-se aparentemente saudáveis (Boes et al., não publicado; Stoffregen et al., 2006). Embora haja os relatos da infecção por hemoplasmas, o papel dos cervídeos na transmissão da bactéria na população silvestre, assim como para rebanhos de ovinos e caprinos, permanece incerto.

No Brasil, oito espécies de cervídeos são descritas (Ministério do Meio Ambiente, 2008), incluindo o *Blastocerus dichotomus*, *Mazama nana*, *M. americana*, *M. gouazoubira*, *M. bororo*, *M. rufina*, *Odocoileus virginianus* e *Ozotoceros bezoarticus*. De acordo com o CITES (Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies Ameaçadas da Fauna e da Flora Selvagens), duas espécies (*B. dichotomus* e *O. bezoarticus*) estão ameaçadas de extinção, enquanto as demais espécies encontram-se com informação insuficiente para predizer este status (CITES, 2010). Somado a isso, pouco se sabe sobre a suscetibilidade dos cervídeos à doença, assim como sua participação como reservatórios de agentes infecciosos.

O Refúgio Biológico Bela Vista, criatório e zoológico pertencente à Usina Hidrelétrica de ITAIPU Binacional, Foz do Iguaçu, Brasil (25°32'45"S, 54°35'07"O), é responsável por trabalhos de conservação, sanidade e manutenção de espécies ameaçadas da fauna brasileira. Os

cervídeos do refúgio são avaliados rotineiramente quanto ao estado de saúde, por meio de exames clínicos. As amostras de sangue e soro dos animais são enviadas ao Laboratório Ambiental de ITAIPU onde na sessão de Hematologia são realizados os exames de patologia clínica. Já há alguns anos a farmacêutica bioquímica do Laboratório Ambiental, Leonilda Correia dos Santos (comunicação pessoal), observou a presença de alterações morfológicas nas células vermelhas dos cervídeos, alterações nos valores de contagem de hemácias, assim como a presença de estruturas epicelulares aderidas aos eritrócitos, tanto na extensão sanguínea como na contagem em câmara de Neubauer, sugestivas de bactérias no sangue dos animais. Havia relatos de animais cronicamente anêmicos, algumas vezes, com apresentações clínicas da enfermidade. Assim, levantou-se a suspeita da infecção por hemoplasmas nestes animais.

Não existem estudos investigando a infecção por hemoplasmas em cervídeos brasileiros até o momento. Assim, o objetivo deste estudo foi 1) determinar a prevalência da infecção por micoplasmas hemotrópicos em cervídeos Sul Americanos mantidos em cativeiro, 2) realizar a análise filogenética dos isolados encontrados e, 3) avaliar os fatores de risco e as alterações hematológicas associadas à infecção.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local de estudo

Os animais participantes deste estudo são mantidos no Criadouro de Animais Selvagens da Itaipu Binacional (CASIB) e no Zoológico Roberto Ribas Lange (Zoo RRL) (APÊNDICE 1). Ambas as áreas, juntamente com o Hospital Veterinário (HV) pertencem ao Refúgio Biológico Bela Vista que compreende uma área de 1.920 hectares.

Os cervídeos do refúgio são mantidos em cativeiro, sendo que todos os 6 cervos do pantanal (*B. dichotomus*) estão abrigados em um grande recinto nas dependências do zoológico (FIGURA 1) (APÊNDICE 2). No zoológico ainda são mantidos 3 veados bororo machos (*Mazama nana*) em recintos separados, porém limítrofes. Os demais veados bororo (19) e 4 veados mateiro (*M. americana*) são mantidos no criatório em recintos diferentes porém vizinhos, abrigando de 1 a até 6 animais (APÊNDICE 3). Os recintos em ambas as áreas são cercados por telas, o chão é de terra ou gramado e possuem vegetação ao redor e em seu interior (FIGURA 2).

Os animais são alimentados com frutas, capim e ração comercial e são manejados com frequência para exames de saúde. A equipe de veterinários e demais funcionários do refúgio segue um plano de manejo para controle de sanidade e reprodução nos cervídeos.

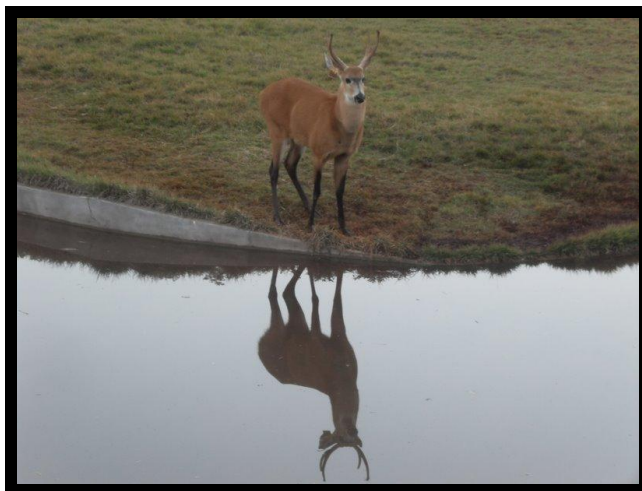


FIGURA 1 – RECINTO DOS CERVOS DO PANTANAL NO ZOOLOGICO ROBERTO RIBAS LANGE  
 FONTE: O autor (2009)



FIGURA 2 – RECINTOS DOS VEADOS BORORO E VEADOS CAMPEIRO NO CRIADOURO DE ANIMAIS SELVAGENS DE ITAIPU BINACIONAL  
 FONTE: O autor (2009)

## 2.2 Animais do estudo e coleta de amostras

Um total de 32 cervídeos foram amostrados, incluindo 22 *M. nana*, 4 *M. americana* e 6 *B. dichotomus* (FIGURA 3). Os animais fazem parte de um programa que assugura a conservação das espécies ameaçadas, iniciado com a inundação das áreas da represa. O período de coletas durou 30 dias, escolhendo-se o mês de setembro (2009) para a realização das atividades considerando o clima mais ameno de primavera (evitaram-se períodos quentes do dia devido a facilidade de hipertermia nos animais anestesiados). Realizou-se a captura e coleta de 3 ou 4 animais por dia na parte da manhã e a realização dos exames laboratoriais no turno da tarde. O grupo de animais coletados compreendeu: 16 machos e 16 fêmeas, 28 adultos (com idade igual ou acima de 1 ano) e 4 filhotes (APÊNDICE 4).

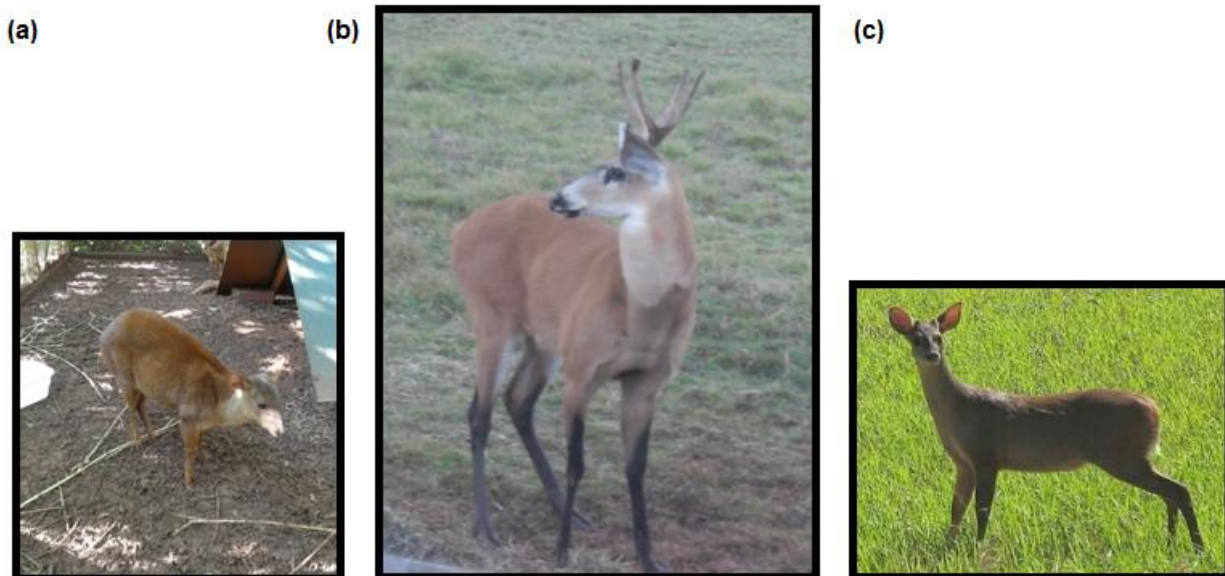


FIGURA 3 – ESPÉCIES DE CERVÍDEOS DO REFÚGIO BIOLÓGICO BELA VISTA INCLUÍDAS NO PROJETO DE PESQUISA DE HEMOPLASMAS. (a) *Mazama nana*; (b) *Blastocerus dichotomus*; (c) *Mazama americana*.

FONTE: o autor (2009).

Nos recintos, a captura dos cervídeos procedeu por meio de contenção química. Os cervídeos foram inicialmente sedados com o uso de dardos lançados a partir de zarabatanas, seguido por anestesia (via intramuscular) com 2% cloridrato de xilazina (0,5 mg/kg) e 10% cloridrato de cetamina (7 mg/kg) para os *M. nana* e *M. americana*, enquanto para os *B. dichotomus* foram utilizados 20% zolazepam (3 mg/kg) e 2% cloridrato de xilazina (0,5 mg/kg). Os animais anestesiados, foram colocados em maca [FIGURA 4 (a)] e nesta, em carro do refúgio próprio para o transporte de animais, foram conduzidos ao HV para o início das coletas de amostras. Durante as coletas, o estado de saúde dos animais foi avaliado. Os animais foram pesados, identificados quando necessário, a biometria, o monitoramento cardíaco, respiratório e aferição da temperatura corporal foram realizados. O monitoramento dos animais seguiu até a fase de recuperação anestésica.

Foram coletadas amostras de sangue total, soro, fezes, carrapatos quando presentes e secreções ocular e nasal. Para o estudo dos hemoplasma foram utilizadas laboratorialmente apenas as amostras de sangue total. As demais amostras seguiram para estudos paralelos no projeto de monitoramento de doenças em cervídeos brasileiros.

As amostras de sangue total foram coletadas por venopunção jugular diretamente em tubos hematológicos a vácuo (BD Vacutainer® Plus Blood Collection Tubes contain K<sub>2</sub>EDTA, BD, Franklin Lakes, NJ USA) de 5 mL contendo anticoagulante EDTA 10% [FIGURA 4 (b)]. Foram coletados 15 mL de sangue de cada animal. Os tubos foram armazenados a 4 °C por 2 horas até a realização das análises hematológicas no Laboratório Ambiental de Itaipu. Apenas



um tubo de 5 mL de cada animal foi utilizado para as análises deste projeto. As amostras remanescentes foram aliquotadas para outros estudos.

Este estudo foi aprovado pela Coordenação de Meio Ambiente da ITAIPU Binacional e pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (protocolo número 22.158 de 12/11/2009) (APÊNDICE 5) e aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da UFPR (APÊNDICE 6).

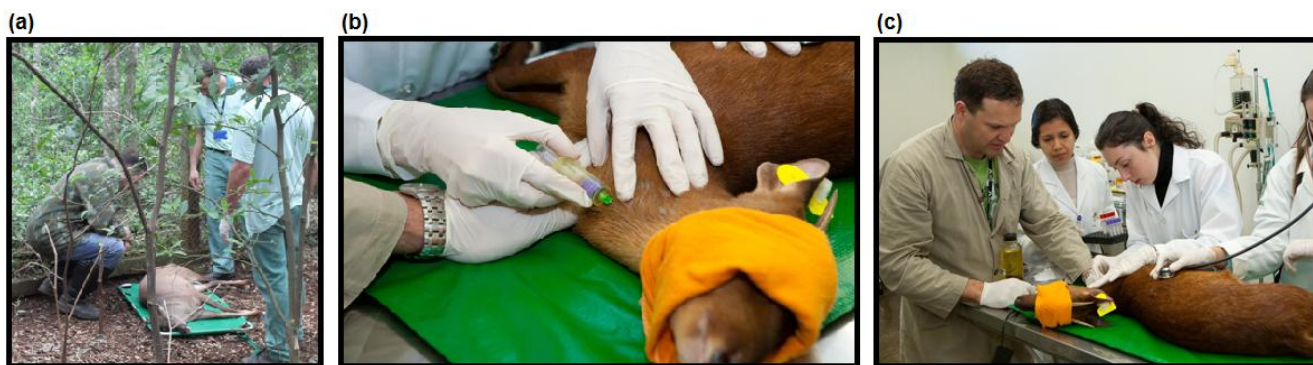


FIGURA 4 – CAPTURA DOS ANIMAIS E COLETA DE AMOSTRAS. (a) Sedação e anestesia dos animais seguido por transporte em maca; (b) Coleta de sangue e (c) monitoramento das funções vitais do animal.

FONTE: Jornal de Itaipu Eletrônico, 2009. (<http://www.itaipu.gov.br/sala-de-imprensa/noticia/cervideos-do-refugio-de-itaipu-terao-raio-x>)

## 2.3 Exames de patologia clínica

Uma vez na sessão de Hematologia do Laboratório Ambiental, as amostras de sangue total foram preparadas para as análises hematológicas (hematócrito, proteína plasmática total e extensões sanguíneas) de acordo com os protocolos de rotina adotados no laboratório (Santos, 1999).

### 2.3.1 Hemogramas:

Para a extensão sanguínea uma pequena gota de sangue total foi extendida em lâmina e após secagem ao ar, as lâminas foram coradas pelo método de May Grunwald-Giemsa. Foi realizada a contagem diferencial de leucócitos em 100 células e o exame qualitativo das células vermelhas por microscopia ótica em aumento de 1.000X, com óleo de imersão. A mesma lâmina corada de extensão sanguínea foi utilizada para avaliação qualitativa de bactérias sugestivas ou não de hemoplasmas no sangue (aumento de 1.000X, com óleo de imersão).

O hematócrito foi realizado pelo método do microhematócrito, através de centrifugação em tubo capilar. Após a leitura do hematócrito a partir do tubo capilar, esse tubo foi quebrado na altura do plasma, e uma gota de plasma foi despejada sobre a superfície de leitura do refratômetro, permitindo a mensuração da proteína plasmática total.

Os valores hematológicos de referência foram obtidos de estudos anteriores em cervídeos (Santos, 1999; Szabo et al., 2005) e do Sistema Internacional de Informação de Espécies (ISIS, 2002) (TABELA 1).

<b>Parâmetro Espécie</b>	<b>Contagem de Células</b>		<b>Hematócrito (L/L)</b>		<b>Proteína Plasmática</b>	
	<b>Brancas <sup>a</sup> (x10<sup>3</sup>)</b>				<b>Total <sup>c</sup> (g/dL)</b>	
	<b>Machos</b>	<b>Fêmeas</b>	<b>Machos</b>	<b>Fêmeas</b>	<b>Machos</b>	<b>Fêmeas</b>
<i>Blastocerus dichotomus</i>	5.2-9.5	5.2-9.5	0.33-0.44	0.34-0.41 <sup>a</sup>	6.8-9.2	6.6-9.8
<i>Mazama nana</i>	2.2-4.3	2.2-4.3	0.36-0.44	0.34-0.38 <sup>a</sup>		
<i>Mazama americana</i>	1.3-15.8	2.2-0.10	0.11-0.54	0.17-0.52 <sup>b</sup>		

TABELA 1 – VALORES HEMATOLÓGICOS DE REFERÊNCIA PARA AS ESPÉCIES DE CERVÍDEOS ESTUDADAS. Reference values were retrieved from: <sup>a</sup> Santos, 1999; <sup>b</sup> International Species Information System, 2002 e <sup>c</sup> Szabo et al., 2005.

## 2.4. Microscopia eletrônica

O protocolo para a realização da microscopia eletrônica foi realizado em três etapas. A primeira etapa foi realizada no Laboratório Ambiental de Itaipu onde fez-se a fixação das amostras. A segunda etapa de preparo das amostras nas lâminas foi realizado no departamento de Biologia Celular da UFPR. E a última etapa, de leitura das lâminas em microscópio foi conduzida no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

Etapa um: Após a coleta, uma alíquota de 2 mL de sangue total foi destinada à microscopia eletrônica de varredura. O processamento dos eritrócitos foi executado como descrito por CHUNG et al., 2007. A amostra foi centrifugada a 2.000 rpm a fim de se obter a separação dos seus componente em plasma, papa de leucócitos e plaquetas e papa de hemácias. O sobrenadante (plasma) e a camada de leucócitos e plaquetas foram descartados. As hemácias centrifugadas foram lavadas 3 vezes com tampão Ringer-NaCl, em seguida, o fixador glutaraldeído 2% foi adicionado à amostra na proporção de 2:1. Permitiu-se a fixação da amostra durante 2 horas em temperatura de 4°C. Após, houve nova centrifugação, retirada do sobrenadante e acréscimo de tampão Ringer-NaCl. As amostras fixadas foram armazenadas à 4°C até o uso.

Etapa dois: O material foi desidratado em série alcoólica crescente e acetona, sendo o ponto crítico obtido em um Bal-Tec CPD – 030 com gás carbônico. Em seguida procedeu-se a metalização em ouro obtida em um Balzers SCD – 030.

Etapa três: As análises e a documentação do material foram feitas no microscópio eletrônico de varredura JEOL-JSM 6360 LV (JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

Considerando-se que as amostras para microscopia eletrônica devem ser preparadas imediatamente após a coleta com a amostra a fresco (manutenção da integridade das células) e ainda, as dificuldades de uma segunda coleta de amostras em animais silvestres, as



microscopias precisaram ser realizadas antes mesmo das atividades de diagnóstico molecular (que ocorreram em laboratório fora do país). Por estes motivos, não realizamos as microscopias eletrônicas apenas em amostras de animais PCR positivos para hemoplasmas. Das 32 amostras fixadas para a técnica de microscopia eletrônica, 15 foram selecionadas de acordo com a suspeita de hemoparasitas nas extensões sanguíneas coradas para a realização das etapas dois e três e análise em microscópio eletrônico.

## 2.5 Extração de DNA das amostras

As amostras de sangue foram mantidas a -20°C até a realização da extração de DNA. As extrações de DNA das amostras foi realizada no Laboratório de Epidemiologia Molecular e Zoonoses do Hospital Veterinário da UFPR, Paraná, Brasil. O DNA foi extraído a partir de 200 µL de amostra de sangue total usando-se o kit comercial Quick-gDNA™ MiniPrep Kit (Zymo Research Corp., Orange, Califórnia, EUA) conforme instruções do fabricante. A fim de monitorar contaminação cruzada, água ultrapura foi extraída como controle negativo a cada 10 amostras de sangue.

Após a etapa de extração do DNA, todos os demais protocolos e análises foram conduzidos no Laboratório de Micoplasmas Hemotrópicos da Universidade de Purdue, Indiana, EUA.

## 2.6 PCR do gene *housekeeping*

Para confirmar a presença de DNA amplificável nas amostras extraídas, foi realizada a amplificação de um fragmento de 361 pb (exon VI) do gene que codifica a proteína kappa-caseína em búfalos (Genbank EF133463.1) (Otaviano, 2006). O gene da kappa caseína faz parte do DNA nuclear do hospedeiro e é altamente conservado nas espécies tendo sido utilizado para estudos filogenéticos em grandes ruminantes, como os da família Cervidae (Cronin et al., 1996). As sequências dos primers e as referências deste e dos demais protocolos de PCR usados neste trabalho estão descritos na TABELA 2. Amostra de água foi usada como controle negativo da reação e uma amostra de DNA extraído de sangue de cervídeo sabidamente amplificável, foi usada como controle positivo.

Os produtos obtidos na PCR, assim como um marcador de peso molecular 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Glen Burnie, Maryland, EUA) foram aplicados em gel de agarose 1,5% e então separados por eletroforese horizontal usando TAE 1X como tampão de corrida durante o período de 1 hora à 100 V. Subsequentemente o gel foi corado em solução de brometo de etídeo sob agitação por 30 minutos. Os géis foram expostos à luz UV na faixa de 312 nm em transiluminador para a revelação dos fragmentos separados do produto de PCR e

comparação dos tamanhos entre estes fragmentos e marcador de peso molecular. O gel foi fotografado usando o sistema de imagens Epi Chem II Darkroom com a Roper Scientific Camera (UVP, Inc., Upland, Califórnia, EUA).

A definição de resultados positivos e negativos baseou-se na visualização das bandas no gel de agarose fotografado de tamanho de 361 pb para o produto amplificado do gene da kappa-caseína.

## 2.7 PCR para detecção de *Mycoplasma ovis*

Para a detecção de *M. ovis* nas amostras foi realizado um protocolo específico para *M. ovis* previamente descrito (Neimark et al., 2004) para a amplificação de um produto de 224 pb. Como controle positivo de *M. ovis* foi utilizada uma amostra de DNA proveniente de um veado da cauda branca naturalmente infectado e uma amostra de água foi utilizada como controle negativo da reação. Os protocolos de eletroforese e obtenção das imagens do gel foram os mesmos descritos acima.

## 2.8 PCR para a detecção dos genes 16S rRNA e 23S rRNA e sequenciamento

Um par de *primers* (16S Fw e 16S Rv) foi manualmente desenhado a fim de amplificar um produto de 1.370 pb do gene 16 rRNA de *M. ovis*. As sequências nucleotídicas desenhadas para cada *primer*, *forward* e *reverse*, foram complementares a uma região do gene 16S rRNA do *M. ovis* (Genbank AF338268). Em seguida, os oligonucleotídeos iniciadores desenhados foram analisados quanto a sua especificidade e propriedades requeridas para a amplificação por meio dos softwares: Global Aligment do Genestream (Pearson et al., 1997), Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA 4.1) (Tamura et al., 2007), Basic Aligment Search Tool for Nucleotides (BLASTn) (Altschul et al., 1990) e Oligo - PCR  $T_a^{OPT}$  Calculator (Rychlik et al., 1990) (APÊNDICES 7 e 8). Os *primers* foram produzidos pela Integrated DNA Technologies (IDT Inc., California, EUA). A reação de PCR foi constituída por 5 µL de tampão de PCR 5X (50 mM Tris-HCl, pH 8,5, 50 mM NaCl), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 10 pmol de cada *primer*, 1,25 U de GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EUA), água e 5 µL de DNA da amostra, totalizando 25 µL de reação.

Na otimização da reação de amplificação no termociclador, um teste de gradiente de temperatura foi realizado com a amostra controle positivo e com água como controle negativo, encontrando-se 51.6 °C como melhor temperatura de anelamento para a PCR com estes *primers* e para o tamanho de produto desejado.

As condições de ciclagem consistiram em: 4 min de denaturação a 95 °C, seguidos por 39 ciclos de 94 °C por 1 min, 51.6 °C por 30 seg e 72 °C por 1 min e 30 seg, um passo de extensão final a 72 °C por 5 min seguido por resfriamento a 4 °C (PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Inc., Waltham, Massachusettes, EUA).

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese como descrito anteriormente e purificados do gel usando um kit comercial (Zymoclean™ Gel DNA recovery Kit, Zymo Research Corp.). Os produtos do gene 16S rRNA foram diretamente sequenciados no equipamento ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer utilizando-se o kit BigDye® terminator v3.1 mix (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) em ambas as direções com os *primers* 16S Fw e 16S Rv no Purdue Genomics Core Facility, West Lafayette, Indiana, EUA. As sequências obtidas foram conferidas quanto a sua qualidade por visualização dos cromatogramas no programa FinchTV viewer versão 1.4. (Geospiza Inc., Seattle, Washington, EUA).

Para a amplificação de um fragmento de 1.345 pb do gene 23S rRNA, um par de primers (23S Fw e 23S Rv) foi manualmente desenhado baseando-se nas sequências disponíveis de micoplasmas hemotrópicos, *M. suis* e *M. haemofelis*, e dos micoplasmas não hemotrópicos (APÊNDICE 9). A mistura da reação de PCR adotada foi idêntica a mistura de reação para a amplificação do gene 16S rRNA descrita acima.

As condições de ciclagem consistiram em: 2 min de denaturação a 95 °C, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 52 °C por 45 seg, um passo de extensão final de 71 °C por 1 min e 30 seg e um passo de resfriamento a 4 °C. Os produtos purificados foram clonados usando o kit pGEM-T® Easy Vector (Promega Corporation, 139 Madison, Wisconsin, EUA) seguindo instruções do fabricante. Os clones foram purificados usando o kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN Inc., Valencia, Califórnia, EUA) e então sequenciados e mambas as direções.

As sequências nucleotídicas obtidas dos hemoplasmas de cervídeos foram submetidas ao banco de dados do Genbank.

Nome do <i>primer</i>	Sequência do <i>primer</i> (5' to 3')	Tamanho do produto	Tm	Referência
K1 f <sup>a</sup>	CACGTCACCCACACCCACATTTATC	361 pb	56 °C	Otaviano et al., 2006
K2 rv <sup>a</sup>	TAATTAGCCATTTGCGCTTCTCTGT			
340 F <sup>b</sup>	CCATATTCCTACGGAAGC	224 pb	56 °C	Neimark et al., 2004
543 R <sup>b</sup>	CCGGATAATGCTTGACCT			
16S Fw <sup>c</sup>	ATGCAAGTCGAACGAGTAGA	1,370 pb	51.6 °C	Este estudo
16S Rv <sup>c</sup>	TGATACTTTCTTTCATAGTTTG			
23S Fw <sup>d</sup>	RNAKGGGAGTGAAATAGA	1,345 pb	52 °C	Este estudo
23S Rv <sup>d</sup>	CTTAGGACCGTTATAGTTAC			

TABELA 2 – *Primers* USADOS PARA AMPLICAÇÃO DOS GENES DA KAPPA-CASEÍNA, 16S rRNA E 23S rRNA. <sup>a</sup> Gene da Kappa-caseína; <sup>b</sup> Gene do *M. ovís* 16S rRNA; <sup>c</sup> Gene 16S rRNA e <sup>d</sup> Gene 23S rRNA.

FONTE: O autor (2010)

## 2.9 Análise filogenética

As sequências dos genes 16S e 23S rRNA obtidas neste estudo foram comparadas aquelas depositadas no banco de dados do Genbank usando o sistema BLASTn (Altschul et al., 1990) e alinhadas por meio do programa CLUSTAL W (Thompson et al., 1994). Para os dois genes separadamente, as árvores filogenéticas foram construídas através do programa MEGA 4 (Tamura et al., 2007) pelo método de Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987). As substituições de nucleotídeos da matrix de distâncias foram corrigidas com base no modelo de Kimura 2 parameter (Kimura, 1980). Os dados foram reamostrados 1.000 vezes para gerar valores de *bootstrap*.

## 2.10 Análise estatística

Todos os parâmetros foram compilados em planilha do Excel e analisados por meio do Standard Statistical Software (SAS Institute Inc., Cary, Carolina do Norte, EUA). Os dados hematológicos foram transformados nas variáveis categóricas normal/anormal baseando-se nos valores de referência publicados para cada espécie. Os dados de *M. americana* e *B. dichotomus* foram combinados em um único grupo devido ao pequeno número de amostras. A análise estatística univariada foi utilizada para verificar a associação entre a infecção por micoplasma e os fatores de risco (espécie, sexo, idade, origem e presença de carrapatos), alterações hematológicas (contagem de células brancas, hematócrito e proteína plasmática total) foram conduzidas usando os testes de Chi-quadrado ou de Fisher (quando apropriado). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando  $P < 0.05$ .

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Hematologia

Nas análises das extensões sanguíneas coradas dos 32 animais nenhuma estrutura foi convincente para a presença de hemoplasmas aderidos às hemácias.

As médias e os desvios padrões dos parâmetros avaliados nos hemogramas e da proteína plasmática total desses animais, separados por espécies, estão descritos nos APÊNDICES 10 e 11.

### 3.2 Microscopia eletrônica

Das 15 amostras analisadas, apenas 1 amostra (*M. nana*, fêmea, 1,5 anos, #2404) apresentou estruturas epicelulares convincentes para a presença de hemoplasma. As estruturas foram observadas em grande número na superfície de vários eritrócitos por toda a extensão da lâmina, apresentando em sua maioria a forma cocóide com aproximadamente 0,5-0,75  $\mu\text{m}$  de diâmetro (FIGURA 5).

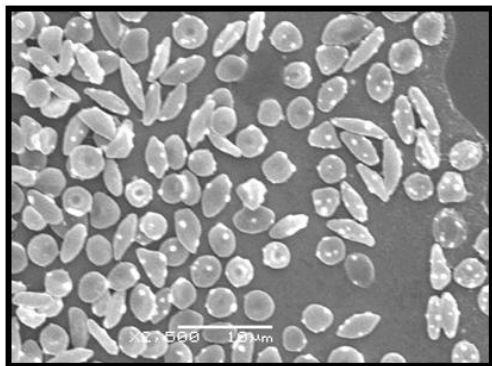


FIGURA 5 – IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA AMOSTRA 2404.

FONTE: O autor (2009)

### 3.3 Prevalência de micoplasmas hemotrópicos

O gene da kappa caseína foi amplificado com sucesso em todas as amostras, exceto em uma amostra proveniente de uma fêmea de *M. americana* (FIGURA 6). Por este motivo, a amostra deste animal foi excluída do estudo (n=31). Um total de 27 animais em 31 (87%) foram positivos pelo protocolo de PCR para *M. ovis* (FIGURA 7), incluindo 21/22 *M. nana*, 2/3 *M. americana* e 4/6 *B. dichotomus*.

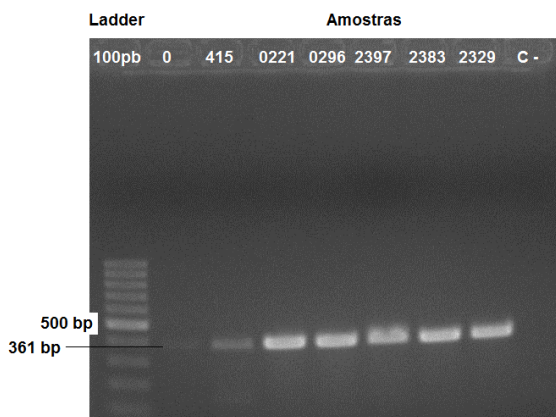


FIGURA 6 – IMAGEM DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS DO GENE DA KAPPA-CASEÍNA.

Amostras 0 e 415 – DNA de cervídeo Norte Americano (*Odocoileus virginianus*);

Amostras 0221 a 2329 – DNA de cervídeos Sul Americanos do estudo e

Controle negativo – água.

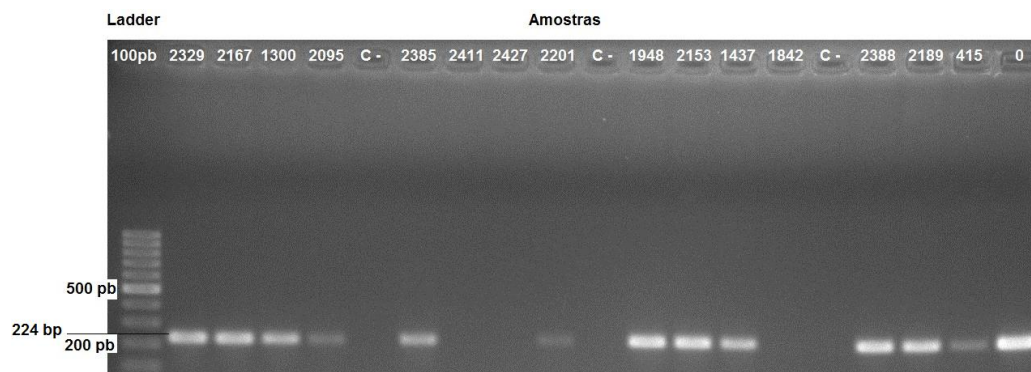


FIGURA 7 – IMAGEM DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS DO GENE DE *M. ovís*.

Controles negativos (C -): água

Amostras 2329 a 2189: DNA de espécies de cervídeos brasileiros do estudo.

Amostras 415 e 0: controles positivos, DNA de cervídeo Norte Americano naturalmente infectado com *M. ovís*

### 3.4 Caracterização molecular de micoplasmas hemotrópicos

O sequenciamento do gene 16S rRNA foi realizado com sucesso em todas as 27 amostras positivas. Vinte e seis sequências apresentaram 98,2-98,8% de identidade ao *M. ovís* de ovino (AF338268) e 98,6-99,4% de identidade ao *M. ovís*-like de cervídeo (FJ82847). Em contraste, um único isolado (1585) obtido de um *B. dichotomus* (fêmea, com mais de 15 anos) apresentou somente 95,1% e 95% de identidade ao gene 16S rRNA do *M. ovís* de ovino e do cervídeo, respectivamente. Na árvore filogenética, este isolado apresentou em ramificação distante do grupo *M. ovís*/*M. wenyonni* (FIGURA 8), enquanto os 7 demais isolados selecionados (2189, 2238, 2167, 1437, 0221, 2385 e 2404) apareceram proximamente relacionados ao *M. ovís* dentro do grupo *M. suis*. Na construção da árvore filogenética, a cada grupo de isolados idênticos entre si para o gene 16S rRNA, apenas um isolado foi selecionado como representante.

Para o gene 23S rRNA, foram sequenciados os isolados 0221, 1585 e *M. ovís*-like do cervídeo. O isolado 1585 mostrou somente 89,4% de identidade ao *M. ovís* do cervídeo, enquanto o outro isolado (0221) apresentou 97,6% de identidade. As árvores filogenéticas construídas, relacionando os isolados dos hemoplasmas aos demais micoplasmas, tanto para o gene 16S rRNA (FIGURA 9), como para o gene 23S rRNA (FIGURA 10), mostraram um perfil similar de posicionamento e ramificações entre os isolados obtidos e os grupos de micoplasmas escolhidos. Da mesma forma que para o gene 16S, o gene 23S rRNA do isolado 1585 apresentou-se fora do grupo *M. ovís*/*M. wenyonni* na árvore filogenética.

Imagens dos géis das amplificações dos genes 16S e 23S rRNA por meio do uso dos pares de primers 16S Fw, 16S Rv e 23S Fw, 23S Rv encontra-se no APÊNDICE 12. As matrizes de distâncias construídas através do programa MEGA 4.1 para as sequências 16S e 23S rRNA de hemoplasmas são apresentadas nos APÊNDICES 13 e 14.

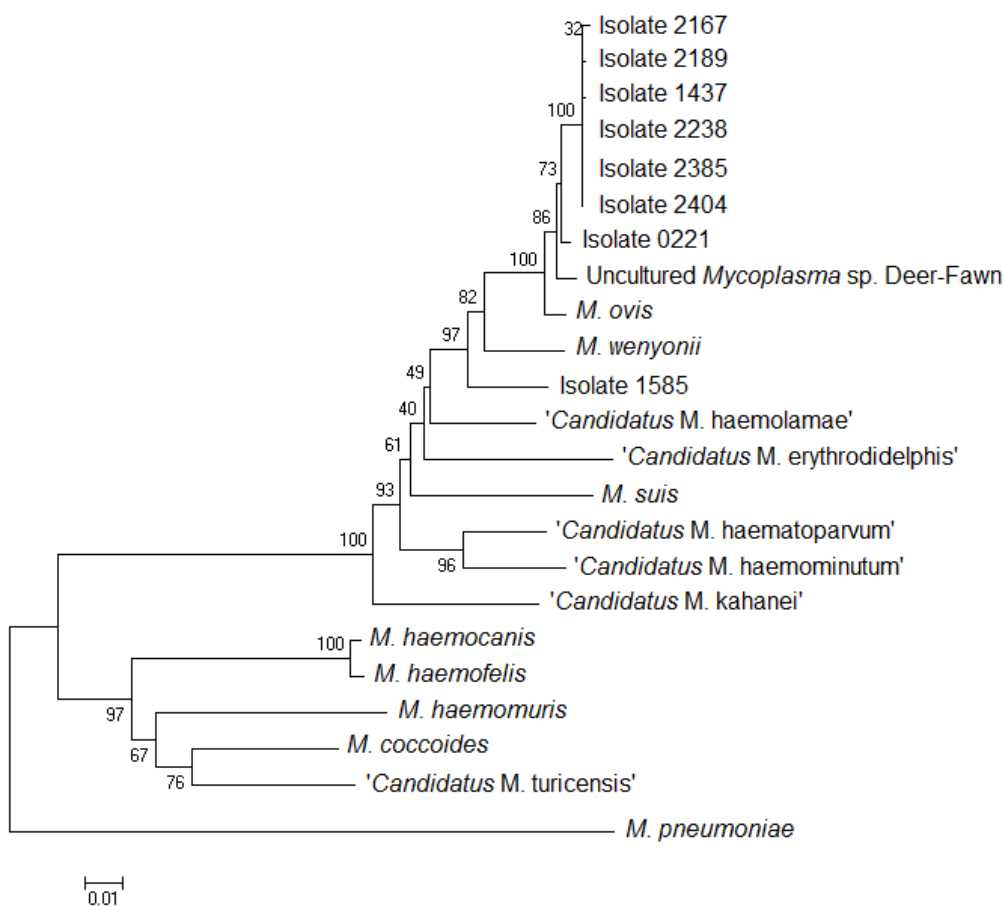


FIGURA 8 – ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NAS SEQUÊNCIAS DOS GENES 16S rRNA DE HEMOPLASMAS. Apresenta o relacionamento dos isolados de hemoplasmas dos cervídeos (1437, 2189, 2167, 2238, 2385, 0221 e 1585) às demais espécies de hemoplasmas pelo método de Neighbor-Joining. Uncultured *Mycoplasma* sp. clone from deer fawn (FJ824847), *M. ovis* (AF338268), *M. wenyonii* (AF016546), '*Candidatus M. erythroidelphis*' (AF178676), '*Candidatus M. haemolamae*' (AF306346), *M. suis* (AF029394), '*Candidatus M. haematoparvum*' (AY383241), '*Candidatus M. haemominutum*' (U88564), '*Candidatus M. kahanei*' (AF338269), *M. haemocanis* (AF197337), *M. haemofelis* (FJ824847), *M. haemomuris* (U95297), *M. coccoides* (AY831867), '*Candidatus M. turicensis*' (M29061) são mostrados. *M. pneumoniae* (M29061) foi usado como *outgroup*. Os valores de *bootstrap* são apresentados nos ramos da árvore.





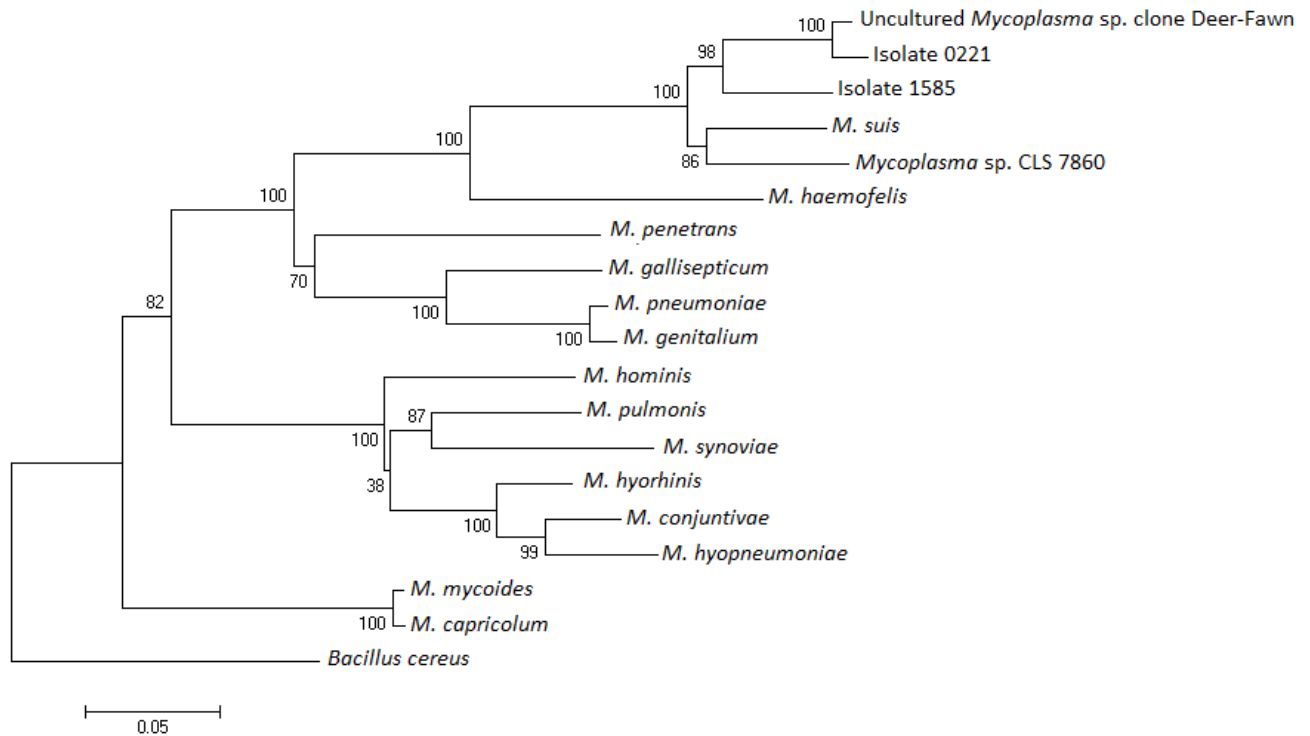


FIGURA 10 – ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NAS SEQUÊNCIAS DOS GENES 23S rRNA DE HEMOPLASMAS E MICOPLASMAS NÃO HEMOTRÓPICOS. Apresenta o relacionamento dos isolados de hemoplasmas dos cervídeos (0221, 1585 e uncultured *Mycoplasma* sp. clone from deer fawn) às demais espécies de hemoplasmas e de micoplasmas não hemotrópicos pelo método de Neighbor-Joining. As identificações (IDs) dos genes 23S rRNA foram obtidos do banco de dados do genoma completo (Genome databases) para cada uma das seguintes sequências: *M. hyorhinis* (9712697), *M. mycoides* (2744514), *M. pulmonis* (911080), *M. gallisepticum* (8999768), *M. pneumoniae* (876745), *M. penetrans* (1041297), *M. genitalium* (875271), *M. hominis* (8658487), *M. synoviae* (3564321), *M. capricolum* (3828641), *M. conjunctivae* (7989489), *M. hyopneumoniae* (3570963), *M. suis* (ADWK01000001), *M. haemofelis* (Santos et al., não publicado. Genome project ID: 50029) e *Mycoplasma* sp. CLS (GU9050061). *Bacillus cereus* foi usado como outgroup. Os valores de *bootstrap* são mostrados nos ramos da árvore.

### 3.5 Números de acesso às sequências dos genes 16S rRNA e 23S rRNA de hemoplasmas

As sequências nucleotídicas dos genes de hemoplasmas obtidas nos cervídeos foram depositadas no GenBank. Após a análise de identidade entre as sequências de hemoplasmas dos cervídeos observado na matrix de distâncias do programa MEGA 4, foi depositada no GenBank uma sequência representante de cada grupo de sequências idênticas entre si. Havendo sequências idênticas encontradas em espécies diferentes de cervídeos, foi depositada no GenBank uma sequência de hemoplasma de cada uma destas espécies de hospedeiro diferentes, devidamente identificados. Os números de acesso são: (a) para o gene 16S rRNA: HQ197742 (isolado 2189), HQ197743 (isolado 2238), HQ197744 (isolado 2167), HQ197745 (isolado 1437), HQ197746 (isolado 0221), HQ197747 (isolado 1585), HQ197748 (isolado 2385), HQ197749 (isolado 2404) e (b) para o gene 23S rRNA: HQ197750 (isolado 1585), HQ197751 (isolado 0221) e HQ197752 (*Mycoplasma* sp. Deer-Fawn).

### 3.6 Fatores de risco e alterações hematológicas associadas à infecção

Nenhuma das variáveis avaliadas foram consideradas significativas ( $P > 0.05$ ) nos cervídeos infectados por hemoplasma (TABELA 3). A presença de infecção não foi associada com os dados espécies, sexo, idade, procedência e presença de carrapatos. Do mesmo modo, as alterações hematológicas (hematócrito, contagem de células brancas e proteína plasmática total) não foram associadas a infecção. Embora 11/27 (40,8%) dos animais positivos apresentavam-se anêmicos, esta alteração não foi associada com a infecção por hemoplasmas.

Variável	Número de animais		P value
	PCR Negativa	PCR Positiva	
Espécies			
<i>Blastocerus dichotomus</i>	2	4	0.085
<i>Mazama nana</i>	1	21	
<i>Mazama americana</i>	1	2	
Sexo			
Macho	2	14	1.000
Fêmea	2	13	
Idade			
Jovem (< 1 ano)	2	2	0.070
Adulto (= ou > 1 ano)	2	25	
Procedência			
Vida livre	2	4	0.1594
Cativeiro	2	23	
Presença de carrapatos			
Ausente	3	19	1.000
Presente	1	8	
Hematócrito			
Normal	3	16	1.000
Alterado	1	11	
Leucócitos			
Leucopenia	2	4	0.1691
Normal	2	22	
Leucócitos			
Leucocitose	0	1	1.000
Normal	2	22	

TABELA 3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA OS FATORES DE RISCO (ESPÉCIE, SEXO, IDADE, PROCEDÊNCIA E PRESENÇA DE CARRAPATOS) E ANORMALIDADES HEMATOLÓGICAS (PPT, Ht% E CONTAGEM DE CÉLULAS BRANCAS) ASSOCIADOS A INFECÇÃO POR HEMOPLASMAS NO GRUPO DE ANIMAIS EXAMINADO.

#### 4. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo a realizar a caracterização de dois hemoplasmas geneticamente distintos em cervídeos de cativeiro da América do Sul. Enquanto a maioria dos isolados, baseados nos genes 16S e 23S rRNA, apresentaram uma identidade alta com o *M. ovis*, um único isolado (1585) divergente foi identificado. Tem sido sugerido que dois isolados bacterianos pertenceriam a diferentes espécies se a identidade do gene 16S rRNA entre eles for menor que 97% (Drancourt e Raoult, 2005). A alta identidade das 26 sequências (98,2-98,4%) ao *M. ovis* sugere que estas sejam linhagens variantes de *M. ovis* e não novas espécies. Entretanto, a identidade encontrada para o *M. ovis* com o isolado 1585 foi de apenas 95,1%. A baixa identidade de sequência encontrada para este isolado e a divergência no padrão filogenético em ambos os genes, sugerem a presença de uma nova espécie de hemoplasma. Considerando que os hemoplasmas contêm apenas uma única cópia deste gene, o sequenciamento do gene 16S rRNA por si só é suficiente para a identificação de espécie. Não há um consenso na literatura acerca do valor de corte aceitável para a identidade de sequências do gene 23S rRNA para o delineamento de novas espécies de bactérias. Entretanto, o encontro de apenas 89,4% de identidade para o gene 23 rRNA entre o isolado 1585 e o *M. ovis* do cervídeo, reforçam a conclusão de que o isolado 1585 é realmente uma nova espécie de hemoplasma. A relevância clínica do isolado 1585 permanece incerta. Porém, é interessante notar que este novo hemoplasma foi identificado no único cervídeo clinicamente doente, apresentando quadro de anemia e sinais clínicos de fraqueza e letargia no momento da coleta de sangue.

No presente estudo, o gene 16S rRNA foi amplificado em 87% das amostras de sangue dos cervídeos pelo protocolo de PCR convencional específico para *M. ovis*. Nos cervídeos Norte Americanos, as infecções naturais foram encontradas em 77,7% (7/9) dos veados da cauda branca (Boes et al., não publicado) por meio dos mesmo protocolo de PCR descrito. Outro relato descrevendo a infecção por hemoplasmas em alces anêmicos mostrou que 60% (9/15) dos animais eram PCR-positivos (Stroffregen et al., 2006). Do mesmo modo, rebanhos ovinos testados por PCR na Argentina mostraram 81% (9/11) de prevalência de *M. ovis* (Aguirre et al., 2009).

Assim como as pesquisas moleculares, as investigações sorológicas mostram a alta prevalência de infecção/exposição de *M. ovis* nos rebanhos ovinos: de 58 a 100% (n=24-26) animais apresentaram títulos em um estudo de monitoramento no período de 4 anos conduzido na Noruega (Brun-Hansen et al., 1997), assim como 44.9% (550/1.224) dos ovinos na Tasmânia foram soropositivos para *M. ovis* (Mason et al., 1989). Provavelmente, a alta prevalência de *M. ovis* nos cervídeos e nos ovinos esteja relacionado ao modo de transmissão da bactéria. Assim, carrapatos e outros vetores, lesões devido ao contato entre animais e

manejo, como também, a transmissão vertical tenham papel fundamental na dispersão da infecção nestas espécies (Kabay et al., 1991; Brun-Hansen et al., 1997; Hornok et al., 2009).

Sabe-se que cervídeos, ruminantes selvagens e outros animais podem compartilhar territórios com rebanhos ovinos e caprinos introduzidos no ambiente (Garde et al., 2005). Consequentemente, tem sido relatada a transmissão cruzada de patógenos por contato direto ou indireto entre ruminantes domésticos e selvagens (Belloy et al., 2003; Richomme et al., 2006). Assim, como o *Mycoplasma ovís* é um agente infeccioso comum aos cervídeos e aos pequenos ruminantes domésticos, a transmissão inter-espécies poderia ser possível e deveria ser investigada.

Até o momento, não houve descrição dos fatores de risco para a infecção por hemoplasmas em cervídeos. Nenhum dos fatores de risco examinados neste estudo para *M. ovís* foi associado com a presença de infecção nos cervídeos. Apenas um estudo molecular anterior avaliou os fatores de risco para a infecção por *M. ovís* em ovinos, porém os animais estavam co-infectados com *Anaplasma ovís* (Hornok et al., 2009). A não significância estatística para os fatores analisados no presente estudo pode ser decorrente a alta prevalência de infecção entre os cervídeos.

A anemia é frequentemente observada em casos de hemoplasmosse aguda causada por *M. ovís* em ovinos e caprinos. Entretanto, ovinos podem mostrar uma infecção subclínica, sem evidências dos sinais clínico-patológicos da doença quando cronicamente infectados (Daddow et al., 1979; Brun-Hansen et al., 1997). No presente estudo, o relacionamento entre a anemia e a infecção por hemoplasma não foi identificado. Apesar de a anemia ter sido encontrada em 40,7% dos animais infectados, todos com exceção de um animal, apresentavam-se clinicamente saudáveis. O único cervídeo doente, um *B. dichotomus*, estava infectado com a nova espécie de hemoplasma descrita acima. Da mesma forma, estudos anteriores de Boes et al. (não publicado) sugerem que cervídeos infectados com hemoplasmas frequentemente não estão anêmicos e não apresentam sinais clínicos da infecção. Já em estudo de Stoffregen et al. (2006) entre nove alces positivos pela PCR seis estavam anêmicos com organismos visíveis nas extensões sanguíneas, enquanto três foram assintomáticos sem a presença de organismos observáveis nas extensões. Assim, permanece incerto se os hemoplasmas podem ou não atuar como um patógeno primário responsável por doença nos cervídeos sob certas circunstâncias.

Embora 27 cervídeos tenham sido positivos para hemoplasma na PCR, nenhum organismo foi convincentemente identificado nas extensões sanguíneas. A presença de estruturas compatíveis com hemoplasmas nas hemácias foi detectada na amostra de apenas um animal, confirmado na PCR. As estruturas foram similares quanto a sua morfologia ao descrito por Stoffregen et al. (2006) em renas. Em estudo de Boes et al. (não publicado) não foram encontrados hemoplasmas no sangue de veados da cauda branca subclínicamente

infectados. Do mesmo modo, o *M. ovis* não tem sido observado em extensões sanguíneas coradas em Giemsa de ovinos cronicamente infectados (Daddow, 1979b). O exame de extensões sanguíneas coradas em laranja de acridina se mostram um pouco mais eficientes na detecção de infecções crônicas (Gulland et al., 1987). Mesmo assim, geralmente baixos níveis de parasitismo eritrocitário são encontrados em infecções crônicas e além disso, a parasitemia é transiente. Entretanto, assim como para os hemoplasmas em outras espécies, a microscopia de luz é um método pouco sensível para a detecção de hemoplasmas em cervídeos com infecções crônicas ou subclínicas.

## 5. CONCLUSÕES

Os cervídeos Sul Americanos (*B. dichotomus*, *M. nana* e *M. americana*) são comumente infectados com espécies de hemoplasmas, incluindo linhagens variantes de *M. ovis* e ainda um novo isolado para o qual os autores propõem o nome de '*Candidatus Mycoplasma dichotomae*'. A prevalência de *M. ovis* nos cervídeos de cativeiro é alta e clinicamente silenciosa. Entretanto, a infecção pelo '*Candidatus Mycoplasma dichotomae*' é menos frequente e pode ser associada com os sinais clínicos. Estes achados sugerem que uma vez presente no plantel, o *M. ovis* possa se espalhar facilmente entre os cervídeos e somado a isso, a infecção parece persistir no plantel. Diante desta realidade, estudos avaliando a patogenicidade e a transmissão dos hemoplasmas em cervídeos seriam de grande contribuição e valia.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, .E. W., LIPMAN, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215: 403–410

AGUIRRE, D. H., THOMPSON, C., NEUMANN, R. D., SALATIN, A. O., GAIDO, A. B., TORIONI DE ECHAIDE, S. 2009. Brote de micoplasmosis clínica por *Mycoplasma ovis* en ovinos de Salta, Argentina. Diagnóstico clínico, microbiológico y molecular. Rev. Arg. Microb. 41: 212-214.[In Spanish]

BELLOY, L., JANOVSKY, M., VILEI, E. M., PILO, P., GIACOMETTI, M., FREY, J. 2003. Molecular Epidemiology of *Mycoplasma conjunctivae* in Caprinae: Transmission across Species in Natural Outbreaks. Applied Environ. Microb. 69: 1913-1919.

BRUN-HANSEN, H., GRONSTOL, H., WALDELAND, H., HOFF, B., 1997. *Eperythrozoon ovis* infection in a commercial flock of sheep. Zentbl. Veterinarmed. B. 44, 295-299.

CITES, Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. CITES Species Database. URL <http://www.cites.org/eng/resources/species.html>. Accessed in August 2010.

CHUNG,S.M., BAE,O.N., LIM,K.M., NOH,J.Y., LEE,M.Y., JUNG,Y.S., CHUNG,J.H. 2007.Lysophosphatidic acid induces thrombogenic activity through phosphatidylserine exposure and procoagulant microvesicle generation in human erythrocytes. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 27:414-421.

DADDOW, K.N., 1979. The transmission of a sheep strain of *Eperythrozoon ovis* to goats and the development of a carrier state in the goats. Aust. Vet. J. 55, 605.

\_\_\_\_\_, K.N., 1979 (b). The natural occurrence in a goat of an organism resembling *Eperythrozoon ovis*. Aust. Vet. J. 55:605-606.

DADDOW, K.N., 1980. *Culex annulirostris* as a 274 vector of *Eperythrozoon ovis* infection in sheep. Vet. Parasitol. 7: 313-317.

DADDOW K.N., 1981. The duration of the carrier state of *Eperythrozoon ovis* infection in sheep (letter). Aust. Vet. J. 57, 49.

DRANCOURT, M., RAOULT, D., 2005. Sequence-based identification of new bacteria: a proposition for creation of an orphan bacterium repository. J. Clin. Microbiol. 43, 4311-4315.

GARDE, E., KUTZ, S., SCHWANTJE, H., VEITCH, A., JENKINS, E., ELKIN, B. 2005. Examining the Risk of Disease Transmission between Wild Dall's Sheep and Mountain Goats, and Introduced Domestic Sheep, Goats, and Llamas in the Northwest Territories. University of Nebraska. Accessed in August 2010. URL: <http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1028&context=zoonoticspub>

GULLAND, F.M., DOXEY, D.L., SCOTT, G.R., 1987. The effects of *Eperythrozoon ovis* in sheep. Res. Vet. Sci. 43, 85-87.

HORNOK, S., MELI, M. L., ERDOS, A., HAJTÓS, I., LUTZ, H., HOFMANN-LEHMANN, R. 2009. Molecular characterization of two different strains of haemotropic mycoplasmas from a sheep flock with fatal haemolytic anaemia and concomitant *Anaplasma ovis* infection. Vet. Microb. 136, 372-377.

ISIS, 2002. Reference for Physiological Values in Captive Wildlife, CD-ROM. International Species Inventory System, Apple Valley, Minnesota.

KABAY, M.J., RICHARDS, R.B., ELLIS, T.E. 1991. A cross-sectional study to show *Eperythrozoon ovis* infection is prevalent in Western Australian sheep farms. Aust. Vet. Journal. 68:170-173.

KIMURA, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16, 111-120.

MASON, R.W., STATHAM, P., 1991. Susceptibility of sheep and goats to *Eperythrozoon ovis* infection. Aust. Vet. J. 68, 116–117.

MESSICK, J.B., 2004. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. Vet. Clin. Pathol. 33, 2-13.

MINISTERIO DO MEIO AMBIENTE, 2008. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Brasília:DF, 2v. 2008. 1420p.[In Portuguese]



NEIMARK, H., JOHANSSON, K.-E., RIKIHISA, Y., TULLY, J.G., 2001. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of `Candidatus Mycoplasma haemofelis`, `Candidatus Mycoplasma haemomuris`, `Candidatus Mycoplasma haemosuis` and `Candidatus 297 Mycoplasma wenyonii`. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 891-899.

NEIMARK, H., HOFF, B., GANTER, M., 2004. *Mycoplasma ovis* comb. Nov. (formerly *Eperythrozoon ovis*), an eperythrocyclic agent of haemolytic anaemia in sheep and goats. Int. J. Syst. Evol. Microb. 54, 365-371.

NIKOL'SKII, S.N., SLIPCHENKO, S.N., 1969. Experiments in the transmission of *Eperythrozoon ovis* by the ticks *H. plumbeum* and *Rh. bursa*. Veterinariia. 5, 46.

OTAVIANO, A. R. 2006. Polimorfismo dos genes das caseínas e sua utilização na detecção de misturas de leite bovino bubalina. 2006. 82 p. Tese (Doutorado em Produção Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista [In Portuguese].

PEARSON, W.R., WOOD, T., ZHANG, Z., MILLER, W. 1997. Comparison of DNA sequences with protein sequences. Genomics. 46:24-36.

PHILBEY, A.W., BARRON, R.C.J., GOUDEN, A., 2006. Chronic eperythrozoonosis in and adult ewe. Vet. Records. 158, 662-664.

RICHOMME, C., GAUTHIER, D., FROMONT, E. 2006. Contact rates and exposure to inter-species disease transmission in mountain ungulates. Epidemiol. Infect. 134: 21-30.

RYCHLIK, W., SPENCER, W.J., RHOADS, R.E. 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. Nuc. Acids Res. 21:6409-6412.

SAITOU, N., NEI, M., 1987. The Neighbor-joining Method: A new method for Reconstructing Phylogenetic Trees. Mol. Biol. Evol. 4, 406-425.

SAITOU, N., NEI, M., 1987. The Neighbor-joining Method: A new method for Reconstructing Phylogenetic Trees<sup>1</sup>. Mol. Biol. Evol. 4, 406-425.

SANTOS, L.C., 1999. Laboratório Ambiental. Editora Universitária Edunoinoeste, Cascavel, pp. 233-305.[In Portuguese]

STOFFREGEN, W.C., ALT, D.P., PALMER, M.V., OLSEN, S.C., WATERS, W.R., STASKO, J.A., 2006. Identification of haemycoplasma species in anemic reindeer (*Rangifer tarandus*). J. Wild. Dis. 42, 249-258.

SZABO, M. P. J., MATUSHIMA, E. R., CASTRO, M. B., SANTANA, D. A., PAULA, C. D., DUARTE, J. M. B. 2005. Hematology of free-living Marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) from Southeast Brazil. J. Zoo Wild. Med. 36: 463-469.

TAMURA,K., DUDLEY, J., NEI, 320 M., KUMAR, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24, 1596-1599.

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weigh matrix choice. Nuc. Ac. Res. 22, 4673-4680.

### Capítulo 3 – HEMOPLASMAS EM POPULAÇÕES DE CERVÍDEOS DE VIDA LIVRE: FREQUÊNCIA DA INFECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES ENCONTRADAS

Formatado conforme as “Instruções para autores” da revista Journal of Wildlife Diseases

#### RESUMO

*Mycoplasma ovis* é um hemoplasma responsável por anemia e mortalidade em pequenos ruminantes domésticos e cervídeos. Este trabalho teve como objetivo determinar se o *M. ovis* infecta diferentes populações de cervídeos de vida livre no Brasil. Foram testadas as amostras da papa de leucócitos de 64 *Blastocerus dichotomus* de Porto Primavera (São Paulo), 18 *Ozotoceros bezoarticus* do Pantanal (Mato Grosso do Sul) e 21 *O. bezoarticus* do Parque Nacional das Emas (Goiás). Usando um protocolo de PCR específico para *M. ovis* nas amostras de DNA extraído foram positivos 46/64 (71,9%) cervídeos de Porto Primavera, 10/18 (55,6%) animais do Pantanal e 4/21 (19%) animais do Parque Nacional das Emas, totalizando a frequência de 58,3% de infecção por hemoplasma em cervídeos de vida livre. O sequenciamento e a análise filogenética do gene 16S rRNA revelou 3 espécies de hemoplasma geneticamente distintas nos cervídeos Sul Americanos, incluindo *M. ovis*, ‘*Candidatus Mycoplasma erythroceruae*’ e ‘*Candidatus Mycoplasma dichotomae*’. A análise filogenética do gene 23S rRNA de isolados selecionados confirmou este relacionamento.

Palavras-chave: *Blastocerus dichotomus*, caracterização molecular, cervídeos, frequência, hemoplasma, micoplasma hemotrópico, *Mycoplasma ovis*, *Ozotoceros bezoarticus*.

## ABSTRACT

*Mycoplasma ovis* is a hemoplasma that may cause anemia and mortality in domestic small ruminants and cervids. Our aim was to determine whether *M. ovis* infects various populations of free-ranging deer in Brazil. Buffy coat samples from 64 *Blastocerus dichotomus* from Porto Primavera (Sao Paulo), 18 *Ozotoceros bezoarticus* from Pantanal (Mato Grosso do Sul), and 21 *O. bezoarticus* from Emas National Park (Goias) were tested. Using a *M. ovis*-PCR protocol on extracted DNA, 46/64 (71.9%) deer from Porto Primavera, 10/18 (55.6%) from Pantanal, and 4/21 (19%) from Emas National Park were positive, giving an overall frequency of 58.3% for hemoplasma infection in these wild deer. Sequencing and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene revealed 3 genetically distinct hemoplasma species in South American deer, including *M. ovis*, '*Candidatus Mycoplasma erythrocervae*' and, '*Candidatus Mycoplasma dichotomae*'. Phylogenetic analysis of the 23S rRNA gene from selected isolates confirmed these relationships.

Key words: *Blastocerus dichotomus*, deer, hemoplasma frequency, hemotropic mycoplasma, molecular characterization, *Mycoplasma ovis*, *Ozotoceros bezoarticus*.

## 1. INTRODUÇÃO

O *Mycoplasma ovis* é um micoplasma hemotrópico (hemoplasma) que se adere às células vermelhas das espécies animais hospedeiras, dentre as quais se incluem os ovinos, os caprinos e os cervídeos. Recentemente, o *M. ovis* foi detectado, por meio de técnicas moleculares, em rebanhos de alces (*Rangifer tarandus*) e de veado da cauda branca (*Odocoileus virginianus*) na América do Norte (Stoffregen et al., 2006; Boes et al., não publicado) e em cervídeos de cativeiro da América do Sul, como o cervo do pantanal (*Blastocerus dichotomus*), veado mateiro (*Mazama americana*) e o veado bororo (*M. nana*) (Grazziotin et al., não publicado).

Os cervídeos infectados podem desenvolver a doença aguda e em alguns casos fatal ou o curso crônico da infecção como já descrito nos ovinos. A doença aguda é caracterizada por anemia branda a grave, macro ou microcítica não regenerativa, inflamação intensa, inapetência e edema. Geralmente, os cervídeos infectados não apresentam sinais clínicos da doença, assim como, alterações hematológicas e mesmo organismos não são observados na microscopia ótica das extensões sanguíneas coradas (Stoffregen et al., 2006; Boes et al., não publicado; Grazziotin et al., não publicado). Assim, os cervídeos podem ser portadores crônicos com apresentação subclínica da infecção por hemoplasmas.

Três novas espécies de hemoplasmas foram recentemente relatadas em cervídeos. ‘*Candidatus Mycoplasma erythroceruae*’ e ‘*Candidatus Mycoplasma haemocervae*’ foram identificados em veados sika japonês (*Cervus nippon*) de vida livre no Japão (Watanabe et al., *in press*) e o ‘*Candidatus Mycoplasma dichotomae*’ em cervo do pantanal (*B. dichotomus*) de cativeiro no Brasil (Grazziotin et al., não publicado). A distinção dos organismos como novas espécies baseou-se na identidade de sequências dos genes 16S rRNA, RNase P (Watanabe et al., *in press*) e 23S rRNA (Grazziotin et al., não publicado). Entretanto, a presença e a patogenicidade destas espécies de hemoplasmas em outras populações de cervídeos permanece desconhecida.

O Brasil possui oito espécies de cervídeos que habitam os mais diversos ambientes naturais da América do Sul (Duarte and Gonzalez, 2010; Merino and Rossi, 2010). Entretanto, a agricultura, as atividades pecuárias, a introdução de doenças por animais domésticos, a construção de usinas hidrelétricas e a fragmentação do habitat têm resultado no declínio das populações de cervídeos. Duas espécies de cervídeos brasileiros, *Blastocerus dichotomus* e *Ozotoceros bezoarticus* (veado campeiro), estão incluídos na categoria animais ameaçados com decréscimo do número populacional pela União Internacional de Conservação da Natureza (IUCN, 2010). Em geral, as populações de cervídeos têm compartilhado ambientes com rebanhos de animais domésticos e/ou na presença de carrapatos, podendo ocorrer a

transmissão de doenças infecciosas. Entretanto, até o momento, não há informação sobre a suscetibilidade destas populações de cervídeos de vida livre ao *M. ovis* ou a outros organismos infecciosos.

O objetivo deste estudo foi 1) determinar a frequência da infecção por *M. ovis* em duas espécies de cervídeos ameaçadas provenientes de três populações de vida livre cada uma presente em regiões geográficas distintas e, 2) realizar a caracterização molecular e a análise filogenética dos isolados de hemoplasma.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Animais do estudo e distribuição espacial

Amostras de papa de leucócitos e plaquetas de 103 cervídeos brasileiros foram selecionadas e fornecidas pelo Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, SP, Brasil. As amostras estavam preparadas por criopreservação conforme protocolo descrito por Duarte et al. (1999).

Das 103 amostras selecionadas, 64 foram provenientes de *B. dichotomus* capturados nas margens do rio Paraná, áreas pertencentes a usina hidrelétrica de Porto Primavera (22°25'77"S; 52°58'84"O, São Paulo, Brasil), desde o ano de 1998 (Szabo et al., 2005; Duarte, 2008). As áreas de usina compreendem os estados de São Paulo e do Mato Grosso do Sul, onde se encontra 80% do lago de inundação. A região possui clima tropical com verão úmido e inverno seco, registra temperaturas variando de 10°C a 40°C, pluviosidade média de 1200 a 1400 mm<sup>3</sup> ao ano e umidade relativa do ar de aproximadamente 80%. A área compreende pântanos rasos e planos e densas florestas parcialmente alagadas. O contato entre animais domésticos e cervídeos (FIGURA 1) têm sido observado nestas regiões (Szabo et al., 2007) como também a presença de carrapatos nos cervídeos (Labruna et al., 2002).

Dezoito amostras selecionadas foram coletadas em *O. bezoarticus* capturados nas áreas de fazendas na região de Nhecolândia, município de Corumbá (19°S; 56°O, Mato Grosso do Sul, Brasil) desde o ano de 1995 como descrito por Tiemann et al. (2005). A região compreende o ecossistema do Pantanal, considerado a maior área pantanosa do mundo. O Pantanal é formado por terras planas e baixas, possui clima tropical, com o inverno seco e chuvas no verão, média anual de 25°C de temperatura. A vegetação é formada por pântanos, por pastagens sazonalmente inundadas e florestas onde a fauna silvestre abundante coabita com animais domésticos, incluindo bovinos, ovinos e equinos. Vale ressaltar que esta região possui o maior rebanho ovino do estado com 18.396 cabeças de ovelha (Oliveira et al., 2007) e que o contato entre ovinos e cervídeos tem sido observado (Raquel Juliano, EMBRAPA

Pantanal, comunicação pessoal). A infestação por carrapatos em cervídeos já foi relatada (Campos Pereira et al., 2000).

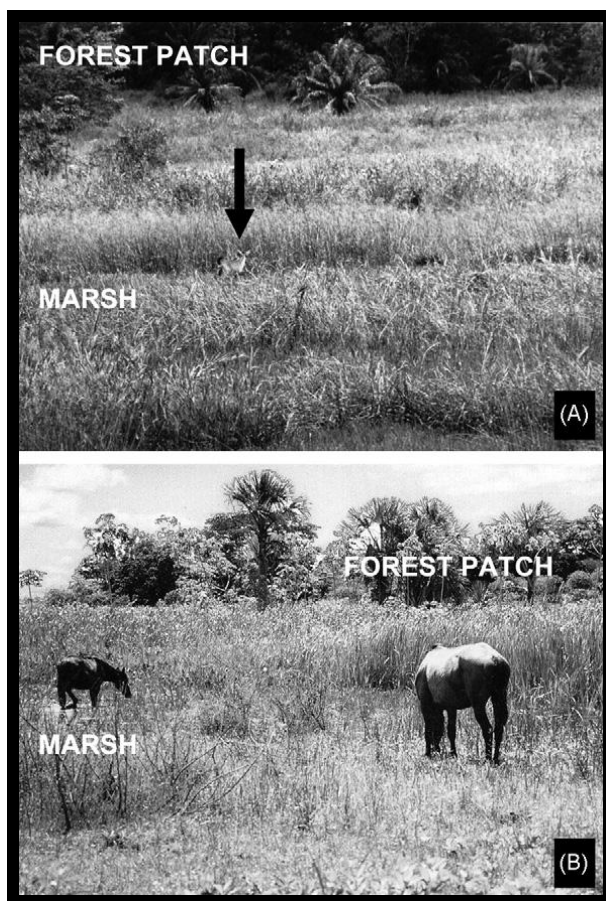


FIGURA 1 – EXEMPLOS DE PÂNTANOS E FLORESTAS SAZONALMENTE INUNDADAS ONDE CARRAPATOS FORAM COLETADOS NO ESTUDO DE SZABO ET AL. (2007). (A) e (B) presença de cervo do pantanal e cavalos compartilhando ambiente. FONTE: Szabo et al. (2007).

Vinte e uma amostras selecionadas foram coletadas em *O. bezoarticus* capturados do Parque Nacional das Emas (18°15'50"S; 52°53'33"O, Goiás, Brasil) desde 1995 como descrito (Tiemann et al., 2005). O Parque Nacional das Emas é considerado a maior área de cerrado no Brasil e a mais preservada no mundo. O clima da região de cerrado possui invernos secos e verões úmidos, com temperaturas variando de 21°C a 40°C em média e pluviosidade de até 1.600 mm<sup>3</sup>. Fazendas de cultivo de soja circundam o parque e não existem relatos sobre o contato entre animais silvestres e animais domésticos para esta região, e nem mesmo sobre a presença de carrapatos nos cervídeos.

A localização das três áreas estudadas está representada em mapa no APÊNDICE 1 e 2.

Em relação às características dos animais incluídos no estudo: 62 eram fêmeas, 40 machos e para 1 não se teve informação; a faixa de idade dos animais cuja idade foi

numericamente estimada alcançou de 0,16 a 11 anos (média de 4,8 anos  $\pm$  2,6 desvio padrão), para outros 42 animais a idade foi apenas classificada em jovem (< 1 ano) e adulto ( $\geq$  1 ano). Considerando-se o grupo todo, 28 animais eram jovens, 73 adultos e 2 não foram definidos.

As atividades com as amostras dos cervídeos possui autorização no Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) obtida pelo NUPECCE. Projeto cervo-do-pantanal de Porto Primavera (29/05/1998 Licença: 108462 - 060/1998 e 05/01/2001 Licença: 108463 - 013/2001) – DIFAS/DIREC. Projeto veado campeiro (09/03/1995 Licença: 108459 – 018/1995) – DIFAS/DIREC.

## 2.2 Hematologia

Os dados hematológicos, incluindo proteína plasmática total (ppt) e/ou valor de hematócrito (Ht%) de 57 *B. dichotomus* do estudo foram fornecidos pela UNESP. As técnicas realizadas para as análises hematológicas foram anteriormente descritas por Szabo et al. (2005). O valor de hematócrito foi obtido com o uso de tubo capilar e centrifugação enquanto o valor da proteína plasmática total foi obtida por técnica de refratometria. Este mesmo trabalho foi usado para os valores de referência de ppt e Ht% em *B. dichotomus* (TABELA 1).

	Jovem		Fêmea adulta		Macho adulto	
	Média $\pm$ Ds. Padrão	Intervalo	Média $\pm$ Ds. Padrão	Intervalo	Média $\pm$ Ds. Padrão	Intervalo
<b>ppt (g/L)</b>	79 $\pm$ 11	60 - 90	82 $\pm$ 8	70 - 102	80 $\pm$ 6	70 - 90
<b>Hematócrito</b>	0.42 $\pm$ 0.04	38 - 53	0.43 $\pm$ 0.05	35 - 57	0.39 $\pm$ 0.05	31 - 47

TABELA 1 – VALORES HEMATÓLOGICOS DE REFERÊNCIA PARA *Blastocerus dichotomus*.

FONTE: SZABO et al., 2005.

## 2.3 Extração do DNA das amostras

O DNA foi extraído a partir de 400  $\mu$ L das amostras de papa de leucócitos e plaquetas usando o kit comercial Quick-gDNA<sup>TM</sup> MiniPrep (Zymo Research Corp., Orange, Califórnia, EUA) conforme as instruções do fabricante.

## 2.4 PCR para o gene conservado Kappa-caseína

Com o objetivo de verificar a presença de DNA amplificável nas amostras, foi realizado um protocolo de PCR para um fragmento de 361 pb (exon VI) do gene que codifica a proteína kappa-caseína em búfalos (Genbank EF133463.1) (Otaviano, 2006). O gene da kappa caseína



faz parte do DNA nuclear do hospedeiro e é altamente conservado nas espécies tendo sido utilizado para estudos filogenéticos em grandes ruminantes, como os da família Cervidae (Cronin et al., 1996). As sequências dos primers e as referências deste e dos demais protocolos de PCR usados neste trabalho estão descritos na TABELA 2. Amostra de água foi usada como controle negativo da reação e uma amostra de DNA extraído de sangue de cervídeo sabidamente amplificável, foi usada como controle positivo.

Os produtos obtidos na PCR, assim como um marcador de peso molecular 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Glen Burnie, Maryland, EUA) foram aplicados em gel de agarose 1,5% e então separados por eletroforese horizontal usando TAE 1X como tampão de corrida durante o período de 1 hora à 100 V. Subsequentemente o gel foi corado em solução de brometo de etídeo sob agitação por 30 minutos. Os géis foram expostos à luz UV na faixa de 312 nm em transiluminador para a revelação dos fragmentos separados do produto de PCR e comparação dos tamanhos entre estes fragmentos e marcador de peso molecular. O gel foi fotografado usando o sistema de imagens Epi Chem II Darkroom com a Roper Scientific Camera (UVP, Inc., Upland, Califórnia, EUA).

A definição de resultados positivos e negativos baseou-se na visualização das bandas no gel de agarose fotografado de tamanho de 361 pb para o produto amplificado do gene da kappa-caseína.

## 2.5 PCR do gene 16S rRNA de *M. ovís*

A amplificação de um fragmento de 224 pb do gene 16S rRNA de *M. ovís* foi realizada conforme protocolo específico descrito por Neimark et al. (2004). Como controle positivo foi utilizada a amostra de DNA extraído a partir do sangue total de um veado da cauda branca naturalmente infectado com *M. ovís*. Água foi utilizada como controle negativo das reações.

## 2.6 PCR dos genes 16S rRNA e 23S rRNA para sequenciamento

Para o sequenciamento foi realizada a PCR convencional com o objetivo de amplificar um fragmento de aproximadamente 1.370 pb do gene 16S rRNA de hemoplasmas e um fragmento de aproximadamente 1.345 bp do gene 23S rRNA de micoplasmas como descrito (Grazziotin et al., não publicado).

Os produtos amplificados em todas as reações foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, posteriormente corados em solução de brometo de etídeo e fotografados sob luz UV à 312 nm. Os produtos dos genes 16S rRNA e 23S rRNA foram purificados do gel (Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit, Zymo Research Corp.) e sequenciados nas duas direções pelo Purdue Genomics Core Facility, West Lafayette, Indiana, EUA.

Nome do primer	Sequência do primer (5' to 3')	Tamanho do produto	Tm	Referência
K1 f <sup>a</sup>	CACGTCACCCACACCCACATTTATC	361 pb	56 °C	Otaviano et al., 2006
K2 r <sup>a</sup>	TAATTAGCCATTTTCGCCTTCTCTGT			
340 F <sup>b</sup>	CCATATTCCTACGGGAAGC	224 pb	56 °C	Neimark et al., 2004
543 R <sup>b</sup>	CCGGATAATGCTTGTGACCT			
16S Fw <sup>c</sup>	ATGCAAGTCGAACGAGTAGA	1,370 pb	51.6 °C	Grazziotin et al., não publicado
16S Rv <sup>c</sup>	TGATACTTTCTTTCATAGTTTG			
23S Fw <sup>d</sup>	RNAKGGGAGTGAAATAGA	1,345 pb	52 °C	Grazziotin et al., não publicado
23S Rv <sup>d</sup>	CTTAGGACCGTTATAGTTAC			

TABELA 2 – *Primers* USADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DA KAPPA-CASEÍNA, 16S rRNA E 23S rRNA. <sup>a</sup> Gene da Kappa-caseína; <sup>b</sup> Gene do *M. ovis* 16S rRNA; <sup>c</sup> Gene 16S rRNA e <sup>d</sup> Gene 23S rRNA.

FONTE: O autor (2010)

## 2.7 Análise filogenética

As sequências nucleotídicas obtidas para os genes 16S e 23S rRNA de hemoplasma foram comparadas a outras sequências de micoplasmas disponíveis no banco de dados do GenBank por meio do alinhamento de todas as sequências pelo CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) do programa MEGA 4 (Tamura et al., 2007). Em seguida, as árvores filogenéticas foram construídas usando-se o método de Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987) e as distâncias da matrix construída foram corrigidas empregando-se o modelo de Kimura 2-parameter (Kimura, 1980). Os dados foram reamostrados 1.000 vezes para gerar valores de *bootstrap*.

## 2.8 Número de acesso das amostras no GenBank

As sequências nucleotídicas dos hemoplasmas encontrados nos cervídeos foram submetidas ao banco de dados do GenBank. Para cada grupo de sequências idênticas, escolheu-se uma para representar o grupo e ser depositada no banco de dados. Quando sequências idênticas de hemoplasma foram encontradas em espécies diferentes de hospedeiros, as duas sequências eram depositadas no genbank. As sequências encontram-se publicadas sobre os seguintes números de acesso: (a) para o gene 16S rRNA: HQ634377 - HQ634380; (b) para o gene 23S rRNA: HQ634381 - HQ634383.

## 2.9 Análise estatística

Os valores de ppt e Ht% foram analisados por meio do Standard Statistical Software (SAS Institute Inc., Cary, Carolina do Norte, EUA). A análise estatística univariada foi empregada para verificar a associação entre a infecção por micoplasma e os fatores associados a infecção (ppt e Ht%) através dos métodos do qui-quadrado ou de Fisher. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando  $P < 0.05$ .

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Frequência de micoplasmas hemotrópicos

Todas as 103 amostras foram amplificadas com sucesso pelo protocolo da kappa-caseína, assegurando a presença de DNA amplificável (FIGURA 2). Pelo protocolo de PCR específico para *M. ovis* (FIGURA 3), 60/103 (58,2%) dos animais foram positivos. Dentre as amostras positivas, 46/64 (71,8%) foram procedentes de *B. dichotomus* de Porto Primavera, 10/18 (55,5%) de *O. bezoarticus* do Pantanal e 4/21 (19%) de *O. bezoarticus* do Parque Nacional das Emas.

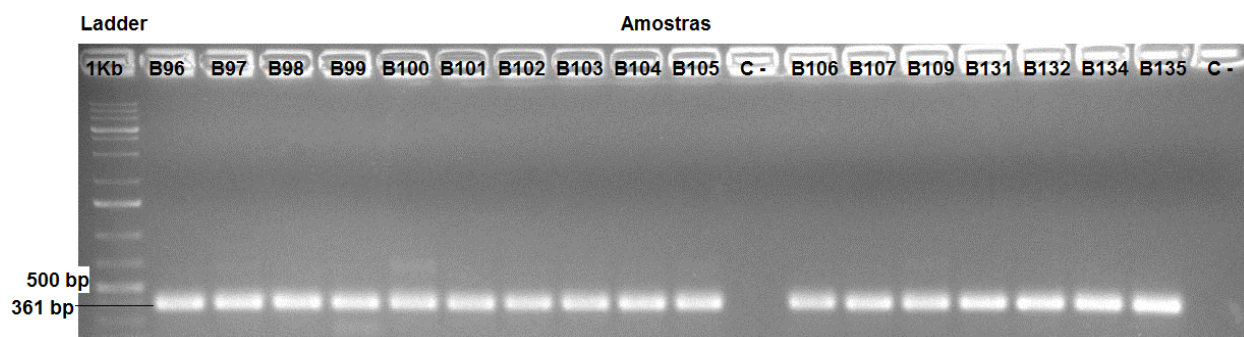


FIGURA 2 – IMAGEM DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS DO GENE DA KAPPA CASEÍNA.

Amostras B96 a B135: DNA de cervídeos do estudo; e Controle negativo (C -): água.

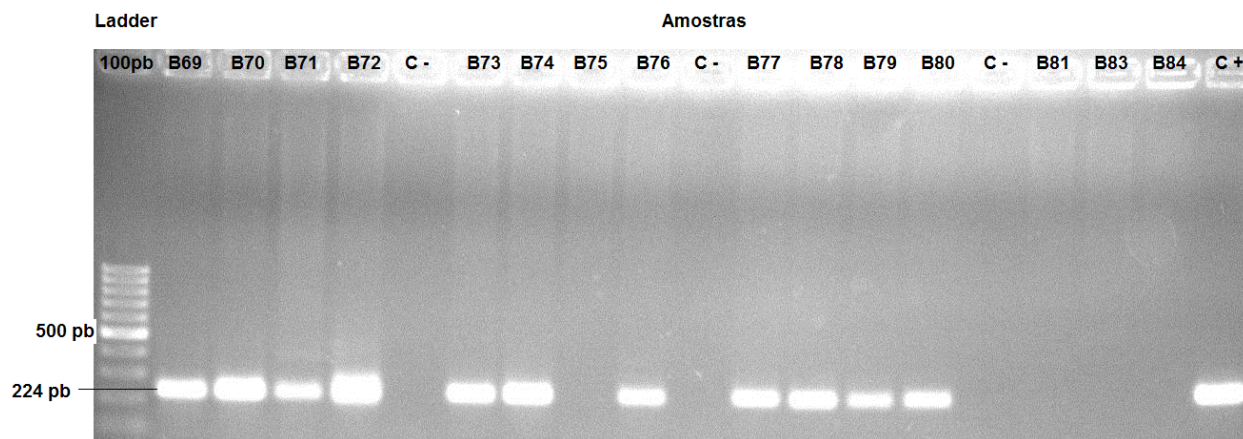


FIGURA 3 – IMAGEM DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS DO GENE 16S rRNA DE *M. ovis*.

Amostras B69 a B84: DNA de cervídeos do estudo; Controle negativo (C -): água; e Controle positivo (C +): DNA de veado da cauda branca infectado com *M. ovis*.

### 3.2 Caracterização molecular dos micoplasmas hemotrópicos

Foram selecionados 18 isolados ou 30% das amostras positivas para realização do sequenciamento do gene 16S rRNA de *M. ovis*. Destas amostras sequenciadas, 9/46 (19,5%) foram selecionadas de Porto Primavera, 5/10 (50%) foram provenientes do Pantanal e 4/4 (100%) do Parque Nacional das Emas. A maior percentagem de amostras selecionadas das regiões do Pantanal e do Parque Nacional das Emas para a realização do sequenciamento deveu-se ao menor tamanho de amostra nestas áreas.

Dentre os 18 isolados, 12 sequências (isolado 1) apresentou 98,9-99% de identidade ao *M. ovis* de ovino (AF338268) e 99-99,5% de identidade ao *M. ovis*-like de cervídeo (FJ824847). Em contrapartida, seis sequências apresentaram somente 95,7-96,5% de identidade ao *M. ovis* e 95,1-96,4% de identidade ao *M. ovis*-like. Cinco amostras de Porto Primavera (isolado 2) mostraram 97,4-98% de identidade ao '*Candidatus Mycoplasma erythrocervae*' (AB558898), enquanto 1 amostra do Pantanal (isolado 3) foi 99,1% idêntico ao '*Candidatus Mycoplasma dichotomae*' (HQ197747) (TABELA 3).

	<i>M. ovis</i> -like Deer Fawn	<i>M. ovis</i>	' <i>Candidatus</i> Mycoplasma erythrocervae'	' <i>Candidatus</i> Mycoplasma dichotomae'	isolado 1	isolado 2	isolado 3
isolado 1	<b>99.4</b>	<b>99</b>	95.7	94.8	100	96.2	95.3
isolado 2	96.1	96.3	<b>98</b>	93.9	96.2	100	94
isolado 3	95.1	95.4	93.2	<b>99.1</b>	95.3	94	100

(a) genes 16S rRNA

	<i>M. ovis</i> -like Deer Fawn	' <i>Candidatus</i> Mycoplasma dichotomae'	isolado 1	isolado 2	isolado 3
isolado 1	<b>98.3</b>	91	100	93.4	91.8
isolado 2	93.4	89.7	93.4	100	90.4
isolado 3	91.4	<b>97.5</b>	91.8	90.4	100

(b) genes 23S rRNA

TABELA 3 – IDENTIDADES (%) ENTRE AS SEQUÊNCIAS PELO VALOR ENCONTRADO NA MATRIX DE DISTÂNCIAS – Kimura 2 parameters model calculado no programa MEGA 4. Os resultados de identidade para as sequências dos genes 16S e 23S rRNA foram baseados em uma sequência representante de cada isolado.

A árvore filogenética (FIGURA 4) confirmou os relacionamentos de identidade encontrados, revelando 3 grupos distintos dentro do grupo do *M. suis*: o isolado 1 foi mais proximamente relacionado ao *M. ovis* de ovino e ao *M. ovis*-like do cervídeo; o isolado 2 foi mostrado em um grupo distinto onde estava presente o '*Candidatus* Mycoplasma erythrocervae'; enquanto o isolado 3 apareceu relacionado ao '*Candidatus* Mycoplasma dichotomae'.

Para o sequenciamento do gene 23S rRNA de hemoplasma foram selecionadas três amostras positivas, cada uma representando um grupo de isolados diferente, encontrados para o gene 16S rRNA. O isolado 1 apresentou 98,3% de identidade ao *M. ovis*-like de cervídeo, enquanto os isolados 2 e 3 apresentaram apenas 93,4 e 91,4% de identidade. Os mesmos isolados apresentaram 91%, 89,7% e 97,5% de identidade ao '*Candidatus* Mycoplasma dichotomae', respectivamente. Considerando-se que não há sequências nucleotídicas disponíveis em banco de dados para o *M. ovis* e para o '*Candidatus* Mycoplasma erythrocervae', as comparações filogenéticas foram baseadas somente nas identidades ao *M. ovis* do cervídeo e ao '*Candidatus* Mycoplasma dichotomae'. A árvore filogenética para o gene 23S rRNA apresentou-se semelhante a árvores gerada para as sequências do gene 16S rRNA. Assim, o isolado 1 manteve-se relacionado ao *M. ovis* do cervídeo, enquanto o isolado 2 apareceu distante do *M. ovis* e o isolado 3 ramificou-se em um grupo distinto, encontrando-se mais próximo do '*Candidatus* Mycoplasma dichotomae' (FIGURA 5).

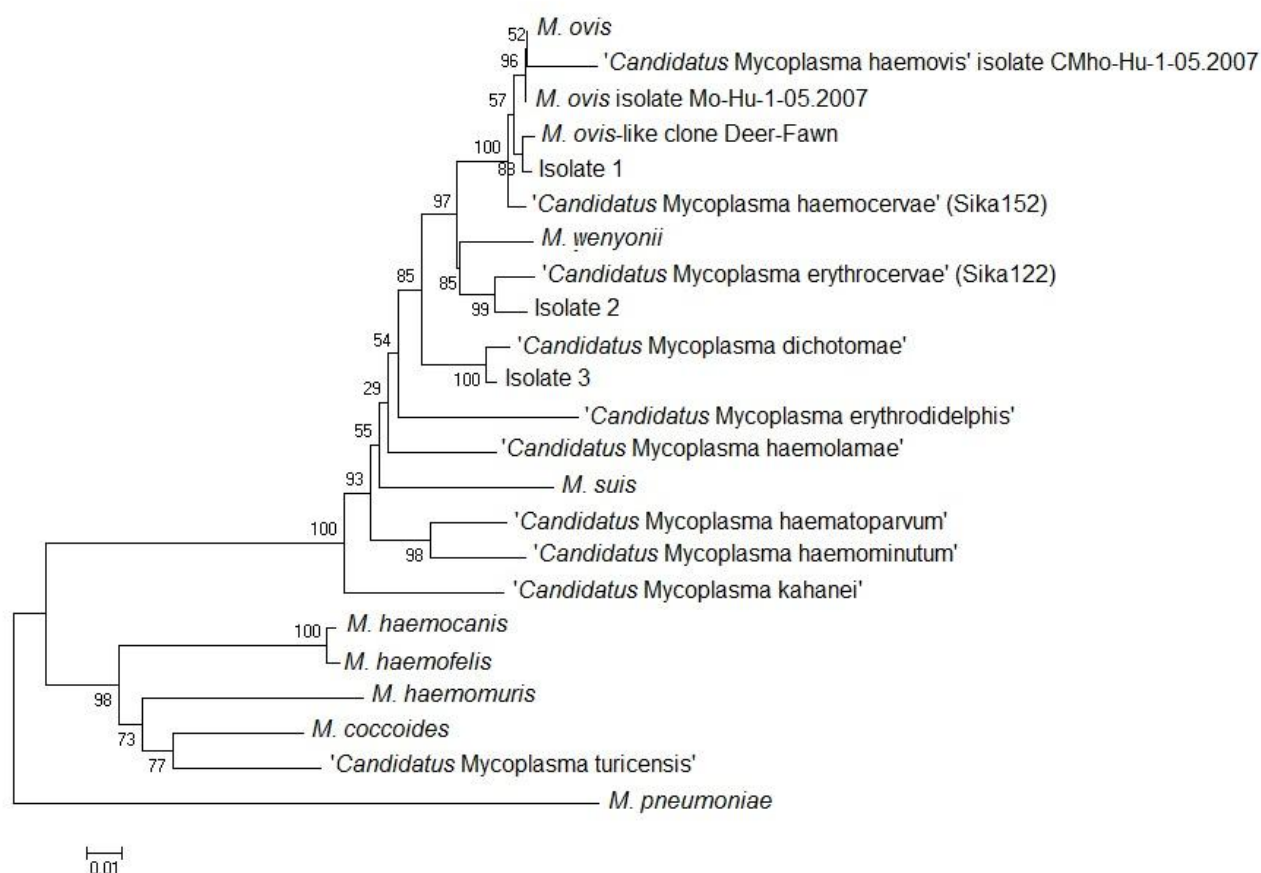


FIGURA 4 – ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NAS SEQUÊNCIAS DOS GENES 16S rRNA DE HEMOPLASMAS. Apresenta o relacionamento dos isolados de hemoplasmas dos cervídeos (1, 2 e 3) às demais espécies de hemoplasmas pelo método de Neighbor-Joining. *Mycoplasma ovis* (AF338268), *M. ovis*-like clone Deer-Fawn (FJ824847), '*Candidatus Mycoplasma dichotomae*' (HQ197747), '*Candidatus Mycoplasma erythroceruae*' (AB558898), '*Candidatus Mycoplasma haemocervae*' (AB558899), *M. ovis* isolate Mo-Hu-1-05.2007 (EU165511), '*Candidatus Mycoplasma haemovis*' isolate CMho-Hu-1-05.2007 (EU165512), *M. wenyonii* (AF016546), '*Candidatus M. erythroidelphis*' (AF178676), '*Candidatus M. haemolamae*' (AF306346), *M. suis* (AF029394), '*Candidatus M. haematoparvum*' (AY383241), '*Candidatus M. haemominutum*' (U88564), '*Candidatus M. kahanei*' (AF338269), *M. haemocanis* (AF197337), *M. haemofelis* (FJ824847), *M. haemomuris* (U95297), *M. coccoides* (AY831867), '*Candidatus M. turicensis*' (M29061) são mostrados. *M. pneumoniae* (M29061) foi usado como outgroup. Os valores de *bootstrap* são dados nos ramos da árvore.

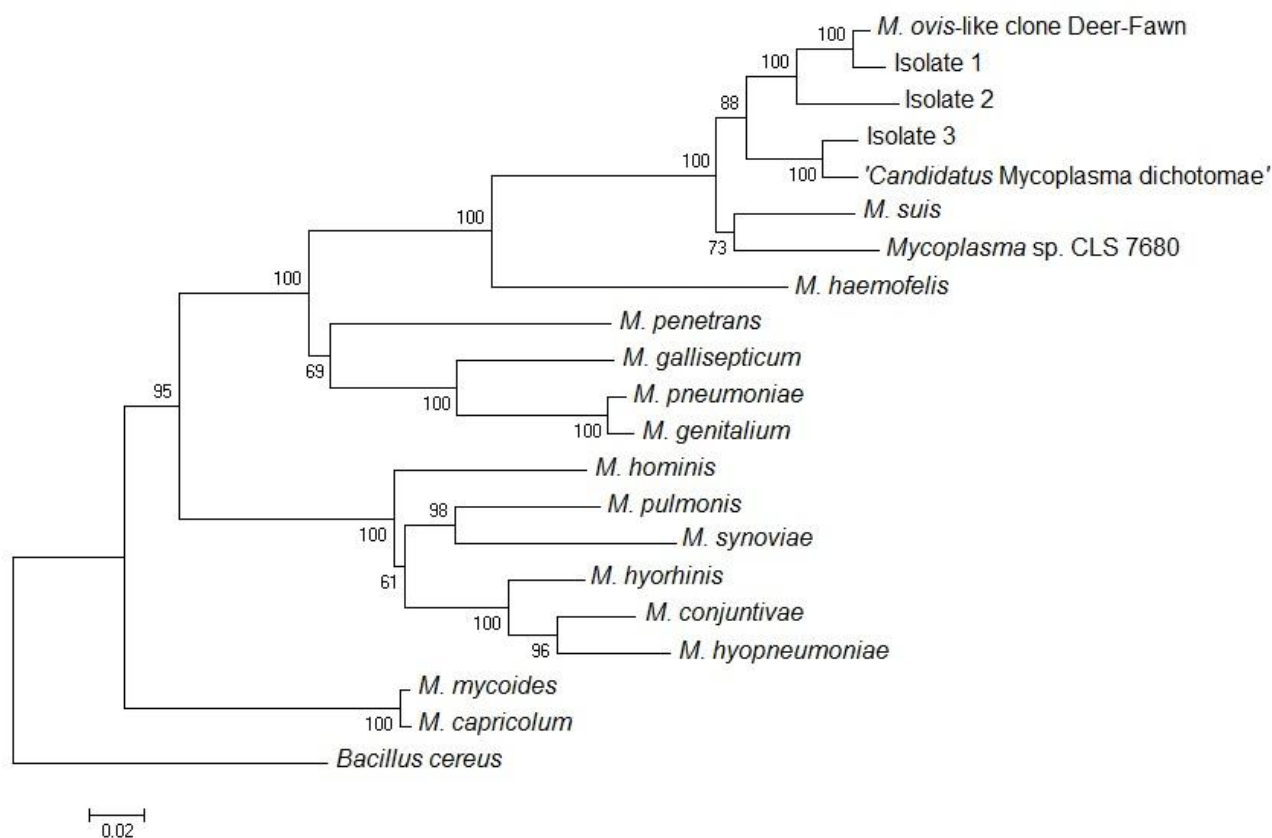


FIGURA 5 – ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA NAS SEQUÊNCIAS DOS GENES 23S rRNA DE HEMOPLASMAS E MICOPLASMAS NÃO HEMOTRÓPICOS. Apresenta o relacionamento dos isolados de hemoplasmas dos cervídeos (1, 2 e 3) às demais espécies de hemoplasmas e de micoplasmas não hemotrópicos pelo método de Neighbor-Joining. As identificações (IDs) dos genes 23S rRNA foram obtidos do banco de dados do genoma completo (Genome databases) para cada uma das seguintes sequências: *M. hyorhinis* (9712697), *M. mycoides* (2744514), *M. pulmonis* (911080), *M. gallisepticum* (8999768), *M. pneumoniae* (876745), *M. penetrans* (1041297), *M. genitalium* (875271), *M. hominis* (8658487), *M. synoviae* (3564321), *M. capricolum* (3828641), *M. conjunctivae* (7989489), *M. hypneumoniae* (3570963), *M. suis* (ADWK01000001), *M. haemofelis* (Santos et al., não publicado. Genome project ID: 50029), *Mycoplasma* sp. CLS (GU9050061), *M. ovis*-like clone Deer-Fawn (HQ197752), '*Candidatus Mycoplasma dichotomae*' (HQ197750). *Bacillus cereus* foi usado como *outgroup*. Os valores de *bootstrap* são mostrados nos ramos da árvore.

### 3.3 Análise hematológica

Dentre os animais positivos para hemoplasma e para os quais havia valores de ppt disponível, somente 2/37 apresentaram valores fora do intervalo de referência para *B. dichotomus* ( $P = 1.000$ ). Do mesmo modo, apenas 4/42 animais positivos mostraram valores anormais de Ht% ( $P = 0.562$ ). Considerando-se o dado significativo quando  $P < 0.05$ , nenhum dos parâmetros avaliados foi associado à infecção por hemoplasmas nestes animais (TABELA 4).

Variável	PCR		Total	P-value
	Negativa	Positiva		
PPT				1.000
Normal	10 (22.22)	35 (77.78)	45	
Alterada	0 (0.00)	2 (100.00)	2	
Ht%				0.562
Normal	14 (26.92)	38 (73.08)	52	
Alterada	0 (0.00)	4 (100.00)	4	

TABELA 4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA AS ANORMALIDADES HEMATOLÓGICAS (PPT, Ht%) ASSOCIADOS À INFECÇÃO POR HEMOPLASMAS NO GRUPO DE ANIMAIS EXAMINADO.

## 4. DISCUSSÃO

Este é o primeiro trabalho a considerar o estudo da infecção por hemoplasmas em diferentes populações de cervídeos de vida livre na América. Embora, as infecções por *M. ovis* sejam descritas há mais de 76 anos em rebanhos de ovinos e caprinos (primeiramente identificado como *Eperythron ovis* por Neitz em 1934), apenas recentemente as espécies de cervídeos têm recebido atenção acerca da infecção. A presença da infecção tem sido relatada em rebanhos de cervídeos e em animais mantidos em cativeiro, entretanto, a ocorrência de hemoplasmas em populações de vida livre é pouco conhecida.

A frequência da infecção por *M. ovis* parece ser menor em cervídeos de vida livre quando comparados aos cervídeos mantidos em rebanhos ou confinados. A população de veados sika japonês (*Cervus nippon*) do Japão apresentou 9% (13/147) dos animais infectados por hemoplasmas (Watanabe et al., *in press*). Em contraste, um grupo de cervídeos Sul Americanos de cativeiro apresentou 87% (27/31) dos animais positivos para *M. ovis* (Grazziotin et al.); um rebanho de cervídeos mantidos em fazenda da América do Norte mostrou 88,8%



(8/9) de infecção (Boes et al.); e um rebanho de cervídeos mantidos em um parque nacional dos EUA mostrou 47,3% (9/19) de prevalência (Stoffregen et al., 2006).

Neste estudo, as frequências de infecção considerando-se as três populações de cervídeos juntas (58,2% ou 60/103) ou mesmo separadas (71,8%; 55,5% e 19%) apresentaram-se mais altas quando comparadas à população de cervídeos de vida livre do Japão (Watanabe et al., *in press*) e mais próximas aos valores encontrados para cervídeos confinados (Boes et al., não publicado; Stoffregen et al., 2006).

As diferenças dos números encontrados entre animais de vida livre e animais de cativeiro possivelmente estão relacionadas às condições de vida e de habitat. Em habitats naturais e não ameaçados, as espécies de cervídeos são comumente de hábitos solitários em grandes períodos do ano, havendo maior contato entre animais nos períodos reprodutivos. Por outro lado, em condições de cativeiro, o contato próximo entre animais, as brigas, condições de estresse, o manuseio e o manejo dos animais são facilitados. O contato com sangue de animais infectados em ferimentos devido ao manejo, a presença de carrapatos e a imunossupressão têm sido sugeridos como possíveis causas para a alta prevalência de infecção por *M. ovis* em rebanhos ovinos (Kabay et al., 1991; Brun-Hansen et al., 1997; Philbey et al., 2006; Hornok et al., 2009) e do mesmo modo, podem ter papel importante na transmissão de hemoplasmas em cervídeos de cativeiro.

As diferenças encontradas entre as populações de vida livre estudadas neste trabalho e a população de cervídeos japoneses (Watanabe et al., *in press*), possivelmente seja explicada pelas condições de habitats do mesmo modo. A espécie de cervídeos japoneses encontra-se classificada como *Least Concern* pela IUCN (2010), significando espécie não ameaçada, assim como os seres humanos são classificados, não sendo considerada para a lista vermelha de espécies em risco. Por outro lado, os cervídeos brasileiros encontram-se na categoria vulneráveis, ameaçados com redução do número populacional. As populações de cervídeos brasileiros sofrem a pressão da fragmentação do ambiente, encontrando-se cada vez mais limitados a pequenas regiões do território, ocupando ambientes onde anteriormente não eram encontrados e em contato cada vez mais próximo a animais domésticos e ao homem. Estas novas condições de vida podem estar favorecendo a transmissão de agentes patogênicos entre as populações de cervídeos no Brasil.

Os resultados encontrados sugerem a possibilidade de uma distribuição espacial distinta para a infecção por *M. ovis* e por outros hemoplasmas dentre as populações de cervídeos de vida livre no Brasil. As regiões de Porto Primavera e do Pantanal, ambas áreas de pântanos e terrenos alagadiços, apresentaram as maiores frequências de *M. ovis* nos animais quando comparadas à região seca do Parque Nacional das Emas. Somado a isso, esta alta prevalência foi encontrada em duas regiões onde a presença de carrapatos nos cervídeos e ainda o contato com animais domésticos foram relatados (Campos Pereira et al., 2000; Labruna

et al., 2005; Szabo et al. 2007) Possivelmente, estas características tenham contribuído para a transmissão de hemoplasmas nestas áreas.

As análises comparativas das sequências dos genes 16S rRNA e 23S rRNA revelaram a presença de três espécies de hemoplasmas geneticamente distintas dentre as populações de cervídeos no Brasil. Entre as amostras sequenciadas houve maior predomínio (12/18) do isolado 1 que se apresentou praticamente idêntico ao hemoplasma ovino identificado em uma ovelha da Alemanha e em outras espécies de cervídeo dos EUA. O isolado 2 representou 5/18 amostras sequenciadas que foram relacionadas ao '*Candidatus Mycoplasma erythrocervae*', enquanto 1/18 (isolado 3) apresentaram maior identidade ao '*Candidatus Mycoplasma dichotomae*'. Ressalta-se que os isolados 2 e 3 revelaram identidade de sequência maior que 97% ao '*Candidatus Mycoplasma erythrocervae*' e '*Candidatus Mycoplasma dichotomae*', respectivamente. Estas análises sugerem que os isolados 1, 2 e 3 sejam espécies diferentes de hemoplasmas.

Os achados clínicos e hematológicos têm sido diversos nos cervídeos infectados por hemoplasmas. No presente estudo, não foi encontrada associação entre a presença de anemia e a infecção por hemoplasmas. Apenas 9% (4/42) dos animais positivos com valores de hematócrito estavam anêmicos. Entretanto, o estado clínico de saúde dos animais não foi avaliado. Em cativeiro, tem sido descrito 40,7% (11/27) dos animais infectados apresentavam-se anêmicos, sendo quase a totalidade deles, clinicamente saudável (Grazziotin et al., não publicado). Da mesma forma, em veados da cauda branca foi observado que a maioria dos animais infectados apresenta-se não anêmico e sem sinais clínicos de doença (Boes et al., não publicado). Possivelmente, uma vez infectados, os cervídeos possam ou não sofrer doença aguda e/ou tornarem-se portadores crônicos da bactéria, assim como descrito em rebanhos ovinos (Philbey et al., 2006; Brun-Hansen et al., 1997).

## 5. CONCLUSÕES

As infecções por hemoplasmas são comuns em cervídeos de vida livre. É provável que condições úmidas e quentes estejam associadas à alta frequência de infecção em certas populações e possam estar relacionadas à presença de carrapatos e à proximidade aos ovinos. Pelo menos três espécies geneticamente distintas de hemoplasmas são encontradas nos cervídeos das regiões estudadas. É importante reconhecer que o par de primers usado para a detecção do *M. ovis* neste e em outros estudos pode não ser espécie-específico. Assim, pode ser possível a amplificação de outros hemoplasmas, embora distintos, proximamente relacionados às espécies que infectam os cervídeos. Outros estudos que investiguem o potencial patogênico destes hemoplasmas nas espécies de cervídeos são necessários.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRUN-HANSEN, H., GRONSTOL, H., WALDELAND, H., HOFF, B., 1997. *Eperythrozoon ovis* infection in a commercial flock of sheep. Zentbl. Veterinarmed. B. 44, 295-299.

CAMPOS PEREIRA, M.; SZABÓ, M.P.J.; BECHARA, G.H.; MATUSHIMA, E.R.; DUARTE, J.M.B.; RECHAV, Y. FIELDEN, L.; KEIRANS, J. E. 2000. Ticks on wild animals from the Pantanal region of Brazil. Journal of Medical Entomology,37(6): 979-983.

CRONIN, M.A., STUART, R., PIERSON, B.J., PATTON, J.C. 1996.K-Casein Gene Phylogeny of Higher Ruminants (Pecora, Artiodactyla). Mol. Phylog. Evol. 6(2):295–311.

DRANCOURT, M., RAOULT, D. 2005. Sequence-based identification of new bacteria: a proposition for creation of an orphan bacterium repository. Journal Clinical Microbiology 43, 4311-4315.

DUARTE, J.M.B. 2008. A technique for the capture of free-ranging marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine 39: 596–599.

DUARTE, J.M.B., GONZALEZ, S. 2010. Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer. Funep/IUCN, Jaboticabal/Gland. 393p.

DUARTE,J.M.B., RAMALHO, M.F.P.D.T., LIMA, V.F.H. de, JORGE, W. 1999. A leukocyte cryopreservation technique for cytogenetic studies. Genetics and Molecular Biology, 22:399-400.

HORNOK, S., MELI, M. L., ERDOS, A., HAJTÓS, I., LUTZ, H., HOFMANN-LEHMANN, R. 2009. Molecular characterization of two different strains of haemotropic mycoplasmas from a sheep flock with fatal haemolytic anaemia and concomitant *Anaplasma ovis* infection. Vet. Microb. 136, 372-377.

IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 17 November 2010.

KABAY, M. J., RICHARDS, R. B., ELLIS, T. E. 1991. A cross-sectional study to show *Eperythrozoon ovis* infection is prevalent in Western Australian sheep farms. Aust. Vet. J. 68: 170-173.

KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.

LABRUNA, M. B., PAULA, C. D. DE, LIMA, T. F., SANA, D. A. 2002. Ticks (Acari: Ixodidae) on Wild Animals from the Porto Primavera Hydroelectric Power Area, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 1133-1136.

MERINO, M. L., AND R. V. ROSSI. 2010. Origin, Systematics, and Morphological Radiation. In Duarte, J.M. B. e González S. *Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer*, FUNEP/IUCN, Jaboticabal/Gland. 393p.

NEIMARK, H., HOFF, B., GANTER, M. 2004. *Mycoplasma ovis* comb. Nov. (formerly *Eperythrozoon ovis*), an eperythrocytic agent of haemolytic anaemia in sheep and goat. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 365-371.

OLIVEIRA, M. F., FILHO, S. C. F. O., HERNANDEZ, I., LEITE, L., SOUZA, J. C., ABREU, U. G. P., SERENO, J. R. B.. 2007. Avaliação Fenotípica de Ovelhas da Raça Texel Criadas na Parte Alta do Pantanal. Corumbá: EMBRAPA Pantanal, 24pp.

OTAVIANO, A. R. 2006. Polimorfismo dos genes das caseínas e sua utilização na detecção de misturas de leite bovino bubalina. Ph.D. Dissertation, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 82 pp. [In Portuguese].

PHILBEY, A.W., BARRON, R. C. J., GOUDEN, A. 2006. Chronic eperythrozoonosis in and adult ewe. *Veterinary Records* 158: 662-664.

SAITOU, N., NEI, M. 1987. The Neighbor-joining Method: A new method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology Evolution* 4: 406-425.

STOFFREGEN, W.C., ALT, D. P., PALMER, M. V., OLSEN, S. C., WATERS, W. R., STASKO, J. A.. 2006. Identification of haemycoplasma species in anemic reindeer (*Rangifer tarandus*). *Journal of Wildlife Diseases* 42: 249-258.

SZABO, M. P. J., E. R. MATUSHIMA, M. B. CASTRO, D. A. SANTANA, C. PAULA, AND J. M. B. DUARTE. 2005. Hematology of free-living Marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) from Southeast Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 36: 463-469.

SZABO, M. P. J., M. B. CASTRO, H. G. C. RAMOS, M. V. GARCIA, K. C. CASTAGNOLLI, A. PINTER, V. A. VERONEZ, G. M. MAGALHAES, J. M. B. DUARTE, AND M. B. LABRUNA. 2007. Species diversity and seasonality of free-living ticks (Acari: Ixodidae) in the natural habitat of wild Marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) in Southeastern Brazil. *Veterinary Parasitology* 143: 147-154.

TAMURA, K., J. DUDLEY, M. NEI, AND S. KUMAR. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology Evolution* 24: 1596-1599.

THOMPSON, J. D., D. G. HIGGINS, AND T. J. GIBSON. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weigh matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.

TIEMANN, J. C. H., S. L. P. SOUZA, A. A. R. RODRIGUEZ, J. M. B. DUARTE, AND S. M. GENNARI, 2005. Environmental effect on the occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in pampas-deer (*Ozotocerus bezoarticus*). *Veterinary Parasitology* 134: 73-76.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A infecção por hemoplasmas em cervídeos apresenta-se bastante diversificada quanto a apresentação, clínica ou subclínica, e mesmo quanto aos isolados genéticos da bactéria. Embora apenas 5 trabalhos tenham sido conduzidos na área, incluindo os dois presentes, na maioria, os cervídeos têm se apresentado como portadores crônicos com apresentação subclínica da infecção. Além disso, 5 isolados de hemoplasma, sendo 2 deles apresentados neste trabalho, encontrados nos cervídeos divergiram molecularmente de *Mycoplasma ovis* descrito em ovinos, evidenciando a descoberta de novas espécies e linhagens de micoplasmas e a necessidade de novos estudos nos cervídeos relacionados a patogenicidade destes microorganismos e a epidemiologia, como a transmissão natural entre cervídeos e ovinos e a detecção em carrapatos.

Considerando os aspectos de conservação das espécies de cervídeos, os estudos na identificação, epidemiologia e impacto das doenças infecciosas, entre outros fatores que afetam a saúde de populações silvestres ameaçadas de extinção são essenciais para o desenvolvimento de estratégias para as criações em cativeiro, programas de reintrodução, repopulação e harmonização entre animais domésticos e silvestres.

## APÊNDICE – CAPÍTULO 2

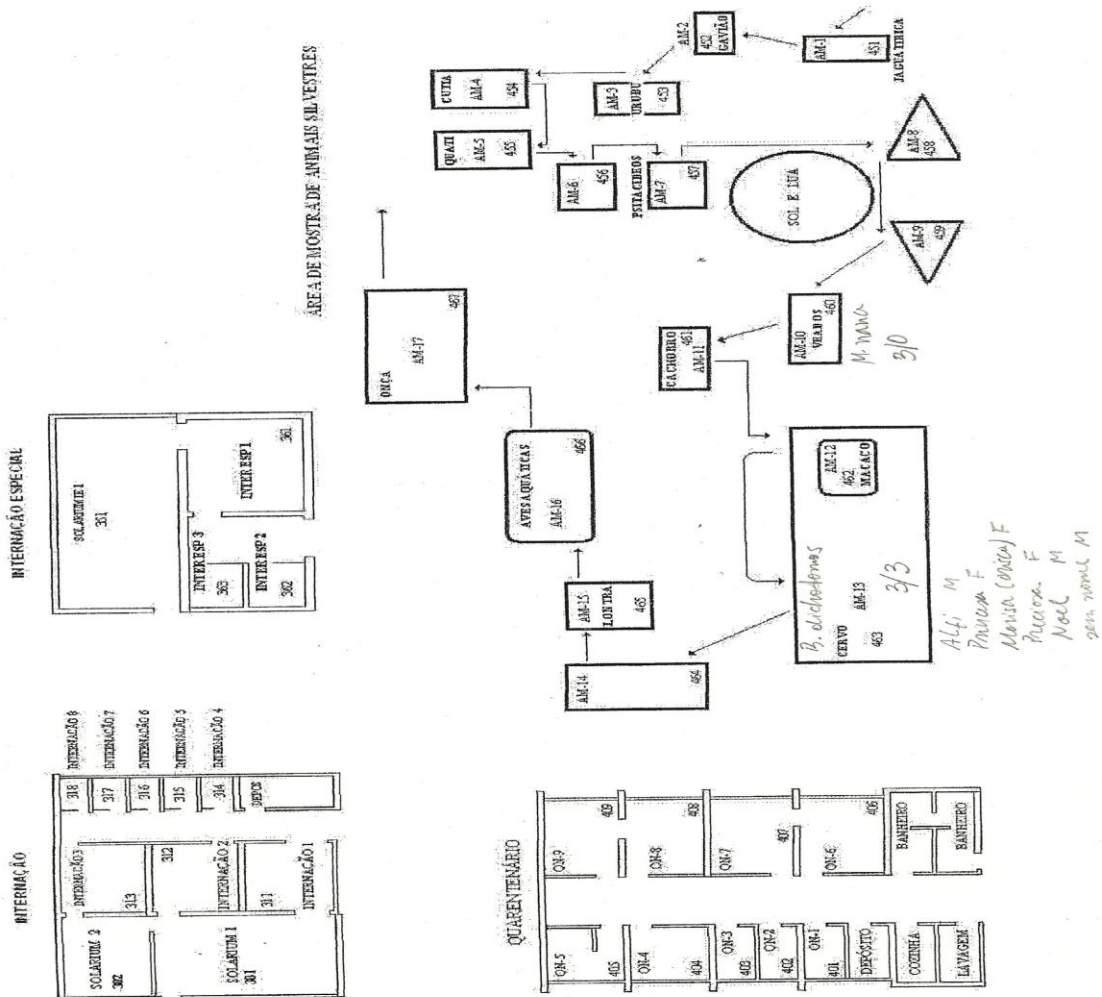
### APENDICE 1 – IMAGEM DE SATÉLITE DA LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DE ITAIPU BINACIONAL E DO REFÚGIO BIOLÓGICO BELA VISTA



Na foto acima: a área circutada representa a entrada da Usina Hidrelétrica de Itaipu Binacional e a área tracejada representa as dependências do Refúgio Biológico Bela Vista. Na foto abaixo, ampliação do Refúgio Biológico Bela Vista: (a) setor administrativo e hospital veterinário, (b) criadouro de animais selvagens e (c) zoológico Roberto Ribas Lange.

FONTE: GOOGLE IMAGERY, 2010.

APÊNDICE 2 - PLANTA BAIXA DAS DEPENDÊNCIAS E RECINTOS LOCALIZADOS NO ZOOLOGICO ROBERTO RIBAS LANGE (recintos onde estão alojados os cervos do pantanal e 3 veados bororo)





APÊNDICE 3 – PLANTA BAIXA DOS RECINTOS LOCALIZADOS NO CRIADOURO DE ANIMAIS SELVAGENS DE ITAIPU BINACIONAL

Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional



APÊNDICE 4 – PLANILHA DE IDENTIFICAÇÃO DOS 32 CERVÍDEOS DO REFÚGIO BIOLÓGICO BELA VISTA PARA O MÊS DAS COLETAS DE AMOSTRAS (SETEMBRO DE 2009). As semanas indicam o período de coletas para aqueles animais.

Projeto Cervídeos 2009 - Planilha de Identificação dos animais de ITAIPU													
<b>1ª Semana</b>	<b>08-11.09</b>												
<b>Procedência</b>	<b>Zoo</b>	<b>Casib</b>	<b>Espécie</b>	<b>Nome científico</b>	<b>Nascimento</b>	<b>Entrada</b>	<b>idade</b>	<b>sexo</b>	<b>recinto</b>	<b>microchip</b>	<b>brinco E.</b>	<b>brinco D.</b>	<b>apelido</b>
	0061	1842	Veado-bororó	<i>Mazama nana</i>	2/2/2000		9	Macho	AM-10	061C-0E77		76	
	0062	2078	Veado-bororó	<i>Mazama nana</i>	12/27/2002		6.5	Macho	AM-10	061B-ED4B		77	
	0063	2092	Veado-bororó	<i>Mazama nana</i>	5/27/2003		6	Macho	AM-10	061B-DDEF		78	
		2243	Veado-bororó	<i>Mazama nana</i>	2/22/2005		4	Macho	21	0629-839A		79	
		2189	Veado-bororó	<i>Mazama nana</i>	5/8/2004		5	Macho	22	062A-OBE1		80	
		2388	Veado-bororó	<i>Mazama nana</i>	3/30/2007		2	Macho	8	01C5-2BB8		81	
<b>2ª Semana</b>	<b>14-18.09</b>												
<b>Procedência</b>	<b>Zoo</b>	<b>Casib</b>	<b>Espécie</b>	<b>Nome científico</b>	<b>Nascimento</b>	<b>Entrada</b>	<b>idade</b>	<b>sexo</b>	<b>recinto</b>	<b>microchip</b>	<b>brinco E.</b>	<b>brinco D.</b>	<b>apelido</b>
		2153	Veado-bororó	<i>Mazama nana</i>	11/28/2003		5.5	Macho	10	0610-9F9F			
		2201	Veado-bororó	<i>Mazama nana</i>	8/30/2004		4.5	Macho	9	061B-EF37		83	
Unesp		1929	Veado-bororó	<i>Mazama nana</i>		12/10/2000	>10	Macho	20	061C-315A		84	
PNI		2427	Veado-mateiro	<i>Mazama americana</i>		4/28/2009	0.3	Fêmea	15		85		
		1948	Veado-bororó	<i>Mazama nana</i>	5/21/2001		8	Macho	11	061C-02F2		86	
		2396	Veado-bororó	<i>Mazama nana</i>	11/24/2007		1.5	Fêmea	11	0621-AE15		87	
		2423	Veado-bororó	<i>Mazama nana</i>	2/20/2009		0.5	Fêmea	11		89		
		2404	Veado-bororó	<i>Mazama nana</i>	2/24/2008		1.5	Fêmea	14	0629-8F63		90	
		1437	Veado-bororó	<i>Mazama nana</i>	1/27/1995		14	Macho	14	061C-30BO		92	
<b>3ª Semana</b>	<b>21-25.09</b>												
<b>Procedência</b>	<b>Zoo</b>	<b>Casib</b>	<b>Espécie</b>	<b>Nome científico</b>	<b>Nascimento</b>	<b>Entrada</b>	<b>idade</b>	<b>sexo</b>	<b>recinto</b>	<b>microchip</b>	<b>brinco E.</b>	<b>brinco D.</b>	<b>apelido</b>
		1300	Veado-bororó	<i>Mazama nana</i>	11/10/1993		15	Fêmea	14	061C-5B85		88	
		2095	Veado-mateiro	<i>Mazama americana</i>	5/31/2003		6	Macho	23	0610-C555		91	
Cascavel/PR		2411	Veado-mateiro	<i>Mazama americana</i>		10/8/2008	1	Fêmea	13	0629-FEA4		93	
Unesp		2385	Veado-mateiro	<i>Mazama americana</i>		2/9/2007	>5	Fêmea	24	0629-FE25		94	
		2390	Veado-bororó	<i>Mazama nana</i>	4/20/2007		2	Fêmea	25	0629-FA76		95	
		2397	Veado-bororó	<i>Mazama nana</i>	11/30/2007		1.5	Fêmea	25	0621-CA82		96	
		1797	Veado-bororó	<i>Mazama nana</i>	6/27/1999		10	Fêmea	8	061C-06FE		97	
		2167	Veado-bororó	<i>Mazama nana</i>	2/11/2004		5	Fêmea	8	0610-B25A		98	
		2329	Veado-bororó	<i>Mazama nana</i>	10/3/2005		3.5	Fêmea	25	0621-D9E8		99	
RBV		2383	Veado-bororó	<i>Mazama nana</i>		10/1/2006	>4	Macho	25	062A-14F2		100	
<b>4ª Semana</b>	<b>28-04.10</b>												
<b>Procedência</b>	<b>Zoo</b>	<b>Casib</b>	<b>Espécie</b>	<b>Nome científico</b>	<b>Nascimento</b>	<b>Entrada</b>	<b>idade</b>	<b>sexo</b>	<b>recinto</b>	<b>microchip</b>	<b>brinco E.</b>	<b>brinco D.</b>	<b>apelido</b>
	0221		Cervo-do-pantanal	<i>Blastocerus dichotomus</i>	7/14/2008		1	Fêmea	AM-13	0621-AFFA			preciosa
Guaira/PR	0023	2238	Cervo-do-pantanal	<i>Blastocerus dichotomus</i>		2/11/2005	4.5	Macho	AM-13	0629-F9D2		0287	alfi
Guaira/PR	0019	1582	Cervo-do-pantanal	<i>Blastocerus dichotomus</i>		1/27/1997	14	Fêmea	AM-13	0610-D4FC	0293		princesa
Guaira/PR	0020	1585	Cervo-do-pantanal	<i>Blastocerus dichotomus</i>		1/27/1997	>15	Fêmea	AM-13	061B-E4E0	0294		marisa
	0205		Cervo-do-pantanal	<i>Blastocerus dichotomus</i>	12/28/2007		1.5	Macho	AM-13	062A-0B15			noel
	0296		Cervo-do-pantanal	<i>Blastocerus dichotomus</i>	6/17/2009		0.1	Macho	AM-13	005.463.731			pucky
		2410	Veado-bororó	<i>Mazama nana</i>	10/2/2008		<1	Fêmea	25	0621-A2FB			

## APÊNDICE 5 – APROVAÇÃO DO ESTUDO PELO IBAMA



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 22158-1	Data da Emissão: 12/11/2009 11:26
<b>Dados do titular</b>	
Nome: Ana Laura Grazziotin	CPF: 048.362.429-24
Título do Projeto: Monitoramento ativo de doenças em cervídeos ( <i>Blastocerus dichotomus</i> , <i>Mazama nana</i> e <i>Mazama americana</i> ) de cativeiro do Refúgio Biológico Bela Vista - Itaipu Binacional, Foz do Iguaçu, Brasil.	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	CNPJ: 75.095.679/0001-49

### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Captura dos animais de cativeiro para coleta de amostras biológicas	12/2009	02/2010
2	exames de patologia clínica e parasitários	12/2009	02/2010
3	Exames sorológicos para doenças infecciosas	03/2010	03/2010
4	compilação e análise estatística dos dados para publicação	04/2010	07/2010

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
5	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
6	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
7	As atividades contempladas nesta autorização abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexploração.

### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Alexander Welker Biondo	Pesquisador	104.159.508-56	172734617 II-SP	Brasileira
2	Leonilda Correia dos Santos	Pesquisadora	338.176.509-49	1.082.900 I.I.PR-PR	Brasileira
3	Edviges Maristela Pituco	Pesquisadora	356.461.959-34	39.879.703-1 SSP-SP	Brasileira
4	Wanderlei de Moraes	Pesquisador	010.992.048-10	13307041 SSP-SP	Brasileira
5	Marcos José de Oliveira	Pesquisador	703.698.879-72	42604780 SSP-PR	Brasileira
6	ZALMIR SILVINO CUBAS	Pesquisador	519.550.249-87	3.187.774-1 IIPR-PR	Brasileira
7	Ivan Roque de Barros Filho	Pesquisador	093.151.948-96	15.751.247 SSP-SP	Brasileira

### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Instituto Biológico	laboratório de diagnóstico (rotina e pesquisa)
2	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	Universidade Federal do Paraná

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 74753229**



Página 1/2

## APÊNDICE 6 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade Federal do Paraná  
Setor de Ciências Agrárias  
Comissão de Ética no Uso de Animais

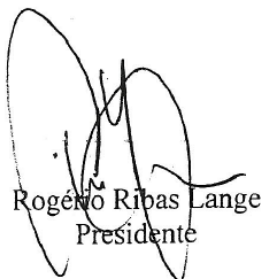
### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo no. 032/2009, referente ao projeto “Pesquisa de micoplasma hemotrópicos em cervídeos (*Blastocerus dichotomus*, *Mazama nana* e *Mazama americana*) do refúgio biológico Bela Vista-ITAIPU Binacional, Foz do Iguaçu, Brasil .”, sob a responsabilidade de Ana Laura Grazziotin, na forma em que foi apresentado, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 15 de dezembro de 2009. Este certificado expira em 15 de dezembro de 2010.

### CERTIFICATE

We certify that the protocol number 032/2009, regarding the project “Search for hemotropic mycoplasma in captive deer (*Blastocerus dichotomus*, *Mazama nana* e *Mazama americana*) of Bela Vista Sanctuary- ITAIPU Binacional, Iguassu Falls, Brazil .”, in charge of Ana Laura Grazziotin, in the terms it was presented, was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Southern Brazil) during session on December 15, 2009. This certificate expires on December, 2010.

Curitiba, 15 de dezembro de 2009.



Rogério Ribas Lange  
Presidente



Fabiano Montiani Ferreira  
Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Setor de Ciências Agrárias  
Universidade Federal do Paraná.

## APÊNDICE 7 – ALINHAMENTO DOS PRIMERS DESENHADOS PARA O SEQUECIAMENTO DE *M. ovis* NO SOFTWARE GENESTREAM.

*Primers* para o sequenciamento do gene 16S rRNA confeccionados baseando-se na sequência de *M. ovis* (AF338268):

16S Fw 5' – ATG CAA GTC GAA CGA GTA GA – 3'

16S Rv 5' - TGA TAC TTT CTT TCA TAG TTT G – 3' (CAA ACT ATG AAA GAA ATC A)

[GeneStream align Home Page](#)

[align Search Help](#)

---

### align Results

**Please cite:** *Pearson, W.R., Wood, T., Zhang, Z., and Miller, W. (1997)*

*Comparison of DNA sequences with protein sequences, Genomics 46: 24-36*

---

```
>_                                     42 nt vs.
>_                                     1458 nt
scoring matrix: , gap penalties: -12/-2
2.9% identity;                               Global alignment score: -2694

907304 -----10
_          AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATTAACTGCTGGTGGTATGCATAACACATGCAAGTCGAAC
          10      20      30      40      50      60
          20
907304 GAGTAGA-----
_          GAGTAGAAGCTTGTCTCTAGTGGCAACGGGCGAGTAATGCATATTTAACTTACTTTTCG
          70      80      90      100     110     120

907304 -----
_          CGAGGAGGATAGCAGCCGAAAGGGCTATTAACTACATAGSTTTATGGACTTGTAAAT
          130     140     150     160     170     180

907304 -----
_          TAAAGGAGGGCGCCTCGGGAGCCTCGGCGGAAAAGGGAATATGTCCTATTAGGTAGTTG
          190     200     210     220     230     240

907304 -----
_          GCGGGGTAAAGGCCACCAAGCCAATGATGGGTAGCTGGACTGAGAGGTGAACAGCCGC
          250     260     270     280     290     300

907304 -----
_          AATGGGATTGAGATATGGCCCATATTCCTACGGGAAGCAGCAGTGAGGAATTTTACAA
          310     320     330     340     350     360

907304 -----
_          TGGACGAAAGTCTGATGGAGCAATACCACGTGAACGATGAAGGTCTTCTGATTGTAAAGT
          370     380     390     400     410     420

907304 -----
_          TCTTTTATTAGGAAAAAAGCGCGCTAGGAAATGAGCGCGCCTTGATGGTACTAATTGA
          430     440     450     460     470     480

907304 -----
_          ATAAGTGACAGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAAAACATAGGTACAAAGCATTATC
          490     500     510     520     530     540

907304 -----
_          CGGATTTATTGGGCGTAAAGGAAGCGTAGGCGGGGAGGCTGATCCATTGTTAAAGGCATT
          550     560     570     580     590     600

907304 -----
```





APÊNDICE 8 – ANÁLISE DOS PRIMERS 16S Fw E 16S Rv POR MEIO DO PROGRAMA MEGA 4. Foram utilizadas sequências de hemoplasmas, de micoplasmas de mucosas e outra sequência fora do grupo dos Mollicutes.

(a) Primer forward: 16S Fw

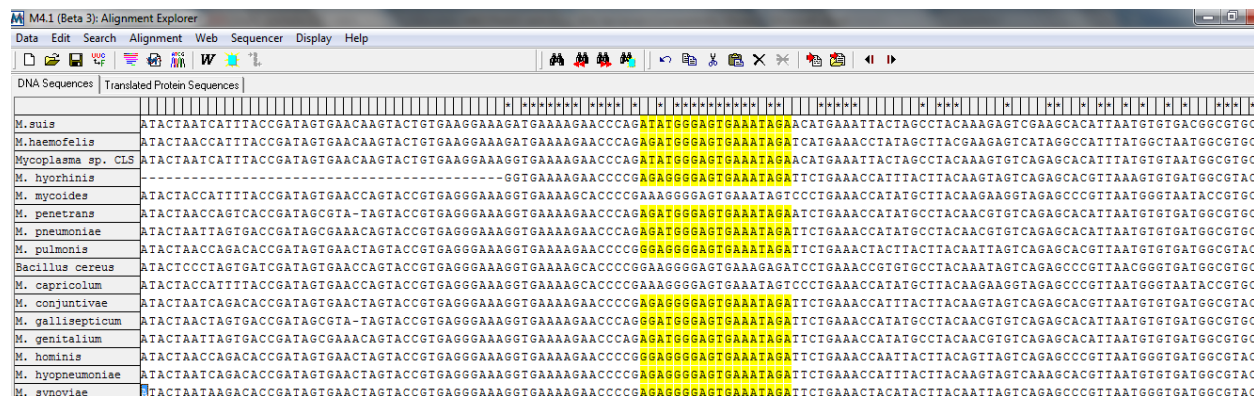
M4.1 (Beta 3): Alignment Explorer	
Data Edit Search Alignment Web Sequencer Display Help	
DNA Sequences   Translated Protein Sequences	
Uncultured deer FJ824947	CATGCAAGTCGAACGAGT--GG--AACTTGTCTCTAGTGGCAAACGGGGCGAGTAATACATATTTAACTTACTTTTCGCGAGTAGAATAGCAGCCGAAAGGGG
wenyonii AF016546	CATGCAAGTCGAACGAGT--GT--AACTTGTCTCTAGTGGCAAACGGGGCGAGTAATACATATTTAACTTACTTTTACGAGGAGGATAGCAGTTGAAAGGAC
canis AF197337	CATGCAAGTCGAACGGACCTTGTGTTTCGGCCAAGGTTAGTGGCAAACGGGGCGAGTAATACATATCTAACATGCCCTCTGTGGGGGATAGCCACTTGAAAAAGT
felis U95297	CATGCAAGTCGAACGGATCTTGTGTTTCGGCCAAGATTAGTGGCAAACGGGGCGAGTAATACATATCTAACATGCCCTCTGTGGGGGATAGCCGCTTGAAAAAGC
muris U82963	CATGCAAGTCGAGCGGAC--CTCTAGCAATAGAGGTTAGCGGGCAAACGGGGCGAGTAATGAATACTTTAACTTACTTCCATGAAGGAAATAGCTATTTCGAAAGAGT
coccoides AY171918	CATGCAAGTCGAACGAATGTGCCCCGAAGGGTACGTTAGTGGCAAACGGGGCGAGTAATACATATTTAACTTACTTTCAGAGGGAATAGCCGCTCGAAAGAC
turicensis AY831867	CATGCAAGTCGAGCGAAC-TGTCCA-AAAGGCA-GTTAGCGGCGAACGGGGCGAGTAATACATATTTAACTTACTTCCGCGAGGGAATAGCCGTTTCGAAAGAAC
haematoparvum AY383241	CATGCAAGTTGAACGAAG--AG--GGCTTGCCCTCTTAGTGGCGAACGGGGCGAGTAACGCATATTTAACTTACTTACGCGAGGAGAAATAGCAATCCGAAAGGGT
haemolamae AF306346	CATGCAAGTCGTACGAAG--CT--AGCTTGTCTAGTGTAGTGGCAAACGGGGCGAGTAATACATATTTAACTTACTTACGCAAGGAAGATAGCAACTCGAAAGAGT
haemominutum U88564	CATGCAAGTCGAACGAAG--AG--GGTTTACTCTCTTAGTGGCGAACGGGGCGAGTAACACATATTTAACTTACTTTCACGAGGAGAAATAGCAACTCGAAAGAGT
kahanei AF338269	CATGCAAGTCGAACGAAG--AA--GTTTACT-TCTTAGTGGCAAACGGGGCGAGTAAACATATTTCAACCTTACTTATGCGAGGAGAAATAGCAACTCGAAAGAGT
ovis AF338268	<b>CATGCAAGTCGAACGAGT--AG--AACTTGTCTCTAGTGGCAAACGGGGCGAGTAATGCATATTTAACTTACTTTTCGCGAGGAGGATAGCAGCCGGAAGGGGC</b>
pneumoniae M29061	CATGCAAGTCGATCGAAA-----GTAGTAATACTTTAGAGGCGAACGGGGCGAGTAACACGTATCCAATCTTACTTTATAATGGGGGATAAGTGTGAAAGACT
erythroidelphus AF178676	CATGCAAGTCGAACGATT--TTTAAGCAATTAAGATAGTGGCGAACGGGGCGAGTAATACATATCTTAACTTACTTTCGCGAGGAGAAATAGCAAGCCGGAAGGGC
Mycoplasma ovis isolate Mo-Hu-1-05.2007	<b>CATGCAAGTCGAACGAGT--AG--AACTTGTCTCTAGTGGCAAACGGGGCGAGTAATACATATTTAACTTACTTTTCGCGAGTAGGATAGCAGCCGGAAGGGGC</b>
Mycoplasma sp. Sika99	<b>CATGCAAGTCGAACGAGT--AG--AACTTGTCTCTAGTGGCAAACGGGGCGAGTAATACATATTTAACTTACTTTTACGAGGAGGATAGCAGTTTCGAAAGGAC</b>
Mycoplasma sp. Sika122	<b>CATGCAAGTCGAACGAGT--AG--AACTTGTCTCTAGTGGCAAACGGGGCGAGTAATACATATTTAACTTACTTTTACGAGGAGGATAGCAGTTTCGAAAGGAC</b>
Candidatus Mycoplasma haemovervae Sika152	<b>CATGCAAGTCGAACGAGT--AG--AACTTGTCTCTAGTGGCAAACGGGGCGAGTAATACATATTTAACTTACTTTTCGCGAGTAGGATAGCAGCCGGAAGGGGC</b>
Candidatus Mycoplasma haemovis isolate CMho-Hu-1-05.2007	<b>CATGCAAGTCGAACGAGT--AG--AACTTGTCTCTAGTGGCAAACGGGGCGAGTAATGCATATTTAACTTACTTTTCGCGAGTAGGATAGCAGCCGGAAGGGGC</b>
M. bovis 313678134:321088-322607	CATGCAAGTCGAGCGATG-----ATAGCAATATCATAGCGGCGAATGGGTGAGTAACACGTACTCAACGTACTCTTTAGATTGGGATAGCGGATGGAAACATC
M. agalactiae 291319937:c669012-667493	CATGCAAGTCGAGCGATG-----ATAGCAATATCATAGCGGCGAATGGGTGAGTAACACGTACTCAACGTACTCTTTAGATTGGGATAGCGGATGGAAACATC

(b) Primer reverse: 16S Rv

M4.1 (Beta 3): Alignment Explorer	
Data Edit Search Alignment Web Sequencer Display Help	
DNA Sequences   Translated Protein Sequences	
Uncultured deer FJ824947	CAGTATGTAATCCTGTGTGAGTATATCAGGGTGAATACGTTCCCGAGGTCCTGTACACACCGCCCGTCAAACTATGAAAAGAAA-GTACAGTCAAAACCG---CA
wenyonii AF016546	CAGTATGTAATCCTGTGTGAGTATATCAGGGTGAATACGTTCCCGAGGTCCTGTACACACCGCCCGTCAAACTATGAAAAGAAA-GTACTAGTCAAAACCG---CA
canis AF197337	CAGTATGTAATCCTGTGTGAGTATATCAGGGTGAATACGTTCCCGAGGTCCTGTACACACCGCCCGTCAAACTATGAGAGGAG-TGGGCATTGAAAAATA---CA
felis U95297	CAGTATGTAATCCTGTGTGAGTATATCAGGGTGAATACGTTCCCGAGGTCCTGTACACACCGCCCGTCAAACTATGAGAGGAG-TGGGCATTGAAAAATA---CA
muris U82963	CAGTATGTAATCCTGTGTGAGTATATCAGGGTGAATACGTTCCCGAGGTCCTGTACACACCGCCCGTCAAACTATGAGAGGGA-GAGGCATTGAAAAACG---CA
coccoides AY171918	CAGTATGTAATCCTGTGTGAGTATATCAGGGTGAATACGTTCCCGAGGTCCTGTACACACCGCCCGTCAAACTATGAGAGGGA-GGGGCATTGAAAAATA---TA
turicensis AY831867	CAGTATGTAATCCTGTGTGAGTATATCAGGGTGAATACGTTCCCGAGGTCCTGTACACACCGCCCGTCAAACTATGAGAGGGA-GGGGCATTGAAAAATA---TA
haematoparvum AY383241	CAGTATGTAATCCTGTGTGAGTATATCAGGGTGAATACGTTCCCGAGGTCCTGTACACACCGCCCGTCAAACTATGAGAGGGA-GAAACGTACTAGTTGAAACCG---TA
haemolamae AF306346	CAGTATGTAATCCTGTGTGAGTATATCAGGGTGAATACGTTCCCGAGGTCCTGTACACACCGCCCGTCAAACTATGAAAAGAAA-GAACTAGTTGAAACCG---CA
haemominutum U88564	CAGTATGTAATCCTGTGTGAGTATATCAGGGTGAATACGTTCCCGAGGTCCTGTACACACCGCCCGTCAAACTATGAGAGAAA-GTACTAGTTGAAACCG---TA
kahanei AF338269	CAGTATGTAATCCTGTGTGAGTATATCAGGGTGAATACGTTCCCGAGGTCCTGTACACACCGCCCGTCAAACTATGAGAGAAA-GTACTAGTTGAAACCG---CA
ovis AF338268	CAGTATGTAATCCTGTGTGAGTATATCAGGGTGAATACGTTCCCGAGGTCCTGTACACACCGCCCGTCAAACTATGAAAAGAAA-GTACTAGTTGAAACCG---CA
pneumoniae M29061	CAGTATGTAATCCTGTGTGAGTATATCAGGGTGAATACGTTCCCGAGGTCCTGTACACACCGCCCGTCAAACTATGAAAAGCTG-GTAATATTTAAAAACG---TG
erythroidelphus AF178676	CAGTATGTAATCCTGTGTGAGTATATCAGGGTGAATACGTTCCCGAGGTCCTGTACACACCGCCCGTCAAACTATGAAAAGAAA-GTACTAGTTAAAAACG---CA
Mycoplasma ovis isolate Mo-Hu-1-05.2007	CAGTATGTAATCCTGTGTGAGTATATCAGGGTGAATACGTTCCCGAGGTCCTGTACACACCGCCCGTCAAACTATGAAAAGAAA-GTACTAGTTAAAAACG---CA
Mycoplasma sp. Sika99	CAGTATGTAATCCTGTGTGAGTATATCAGGGTGAATACGTTCCCGAGGTCCTGTACACACCGCCCGTCAAACTATGAAAAGAAA-GTACTAGTTAAAAACG---TA
Mycoplasma sp. Sika122	CAGTATGTAATCCTGTGTGAGTATATCAGGGTGAATACGTTCCCGAGGTCCTGTACACACCGCCCGTCAAACTATGAAAAGAAA-GTACTAGTTAAAAACG---TA
Candidatus Mycoplasma haemovervae Sika152	CAGTATGTAATCCTGTGTGAGTATATCAGGGTGAATACGTTCCCGAGGTCCTGTACACACCGCCCGTCAAACTATGAAAAGAAA-GTACTAGTTAAAAACG---CA
Candidatus Mycoplasma haemovis isolate CMho-Hu-1-05.2007	CAGTATGTAATCCTGTGTGAGTATATCAGGGTGAATACGTTCCCGAGGTCCTGTACACACCGCCCGTCAAACTATGAAAAGAAA-GTACTAGTTAAAAACG---CA
M. bovis 313678134:321088-322607	CGCTAGTAATCGTAGATACGCTACGCTACGCTGGAATACGTTCTCGGGTCCTGTACACACCGCCCGTCAAACTATGAGAGCTG-GTAATGCCGGAAGTCGGTTTA
M. agalactiae 291319937:c669012-667493	CGCTAGTAATCGTAGATACGCTACGCTACGCTGGAATACGTTCTCGGGTCCTGTACACACCGCCCGTCAAACTATGAGAGCTG-GTAATGCCGGAAGTCGGTTTA

APÊNDICE 9 – ANÁLISE DOS PRIMERS 23S Fw E 23S Rv POR MEIO DO PROGRAMA MEGA 4. Foram utilizadas sequências de hemoplasmas, de micoplasmas de mucosas e outra sequência fora do grupo dos Mollicutes.

(a) Primer forward: 23S Fw



DNA Sequences	Translated Protein Sequences
M. suis	ATACTAATCATTACCGATAGTGAACAGTACTGTGAAGGAAAGTGAAGGAAACCCAGATATGGAGTGAATAGACATGAAATTACTAGCCTACAAAGAGTCGAAAGCACATTAATGTGTGACGGCGTGC
M. haemofelis	ATACTAATCATTACCGATAGTGAACAGTACTGTGAAGGAAAGTGAAGGAAACCCAGATATGGAGTGAATAGACATGAAATTACTAGCCTACAAAGAGTCGAAAGCACATTAATGTGTGACGGCGTGC
Mycoplasma sp. CLS	ATACTAATCATTACCGATAGTGAACAGTACTGTGAAGGAAAGTGAAGGAAACCCAGATATGGAGTGAATAGACATGAAATTACTAGCCTACAAAGAGTCGAAAGCACATTAATGTGTGACGGCGTGC
M. hyorhinis	-----GGTGAAGGAAACCCCGATATGGAGTGAATAGACATGAAATTACTAGCCTACAAAGAGTCGAAAGCACATTAATGTGTGACGGCGTGC
M. mycoides	ATACTAATCATTACCGATAGTGAACAGTACTGTGAAGGAAAGTGAAGGAAACCCAGATATGGAGTGAATAGACATGAAATTACTAGCCTACAAAGAGTCGAAAGCACATTAATGTGTGACGGCGTGC
M. penetrans	ATACTAATCATTACCGATAGTGAACAGTACTGTGAAGGAAAGTGAAGGAAACCCAGATATGGAGTGAATAGACATGAAATTACTAGCCTACAAAGAGTCGAAAGCACATTAATGTGTGACGGCGTGC
M. pneumoniae	ATACTAATCATTACCGATAGTGAACAGTACTGTGAAGGAAAGTGAAGGAAACCCAGATATGGAGTGAATAGACATGAAATTACTAGCCTACAAAGAGTCGAAAGCACATTAATGTGTGACGGCGTGC
M. pulmonis	ATACTAATCATTACCGATAGTGAACAGTACTGTGAAGGAAAGTGAAGGAAACCCAGATATGGAGTGAATAGACATGAAATTACTAGCCTACAAAGAGTCGAAAGCACATTAATGTGTGACGGCGTGC
Bacillus cereus	ATACTCCCTAGTATCGATAGTGAACAGTACTGTGAAGGAAAGTGAAGGAAACCCAGATATGGAGTGAATAGACATGAAATTACTAGCCTACAAAGAGTCGAAAGCACATTAATGTGTGACGGCGTGC
M. capricolum	ATACTAATCATTACCGATAGTGAACAGTACTGTGAAGGAAAGTGAAGGAAACCCAGATATGGAGTGAATAGACATGAAATTACTAGCCTACAAAGAGTCGAAAGCACATTAATGTGTGACGGCGTGC
M. conjunctivae	ATACTAATCATTACCGATAGTGAACAGTACTGTGAAGGAAAGTGAAGGAAACCCAGATATGGAGTGAATAGACATGAAATTACTAGCCTACAAAGAGTCGAAAGCACATTAATGTGTGACGGCGTGC
M. gallisepticum	ATACTAATCATTACCGATAGTGAACAGTACTGTGAAGGAAAGTGAAGGAAACCCAGATATGGAGTGAATAGACATGAAATTACTAGCCTACAAAGAGTCGAAAGCACATTAATGTGTGACGGCGTGC
M. genitalium	ATACTAATCATTACCGATAGTGAACAGTACTGTGAAGGAAAGTGAAGGAAACCCAGATATGGAGTGAATAGACATGAAATTACTAGCCTACAAAGAGTCGAAAGCACATTAATGTGTGACGGCGTGC
M. hominis	ATACTAATCATTACCGATAGTGAACAGTACTGTGAAGGAAAGTGAAGGAAACCCAGATATGGAGTGAATAGACATGAAATTACTAGCCTACAAAGAGTCGAAAGCACATTAATGTGTGACGGCGTGC
M. hyopneumoniae	ATACTAATCATTACCGATAGTGAACAGTACTGTGAAGGAAAGTGAAGGAAACCCAGATATGGAGTGAATAGACATGAAATTACTAGCCTACAAAGAGTCGAAAGCACATTAATGTGTGACGGCGTGC
M. synoviae	ATACTAATCATTACCGATAGTGAACAGTACTGTGAAGGAAAGTGAAGGAAACCCAGATATGGAGTGAATAGACATGAAATTACTAGCCTACAAAGAGTCGAAAGCACATTAATGTGTGACGGCGTGC

(b) Primer reverse: 23S Rv



DNA Sequences	Translated Protein Sequences
M. suis	CGAATATGAAGTATATGTGGCGACACCTGCCCGTGGCCAGAGGTCAGGAGGTTGTTAGGCTAGTTTACTAGCTGAAGCTTCTAATTAAGCCCTGGTGAACGGCGGCCGTAACCTATACGGTCTCTAAGG
M. haemofelis	GTAAGATTAGGTATATGTGGCGACACCTGCCCGTGGCCAGAGGTCAGGAGGTTGTTAGGCTAGTTTACTAGCTGAAGCTTCTAATTAAGCCCTGGTGAACGGCGGCCGTAACCTATACGGTCTCTAAGG
Mycoplasma sp. CLS	CAAAATATGAAGTATATGTGGCGACACCTGCCCGTGGCCAGAGGTCAGGAGGTTGTTAGGCTAGTTTACTAGCTGAAGCTTCTAATTAAGCCCTGGTGAACGGCGGCCGTAACCTATACGGTCTCTAAGG
M. hyorhinis	GTAAATATGAAGTATATGTGGCGACACCTGCCCGTGGCCAGAGGTCAGGAGGTTGTTAGGCTAGTTTACTAGCTGAAGCTTCTAATTAAGCCCTGGTGAACGGCGGCCGTAACCTATACGGTCTCTAAGG
M. mycoides	GCAAGACGATATATGTGGCGACACCTGCCCGTGGCCAGAGGTCAGGAGGTTGTTAGGCTAGTTTACTAGCTGAAGCTTCTAATTAAGCCCTGGTGAACGGCGGCCGTAACCTATACGGTCTCTAAGG
M. penetrans	GTAAGGTGATGATATATGTGGCGACACCTGCCCGTGGCCAGAGGTCAGGAGGTTGTTAGGCTAGTTTACTAGCTGAAGCTTCTAATTAAGCCCTGGTGAACGGCGGCCGTAACCTATACGGTCTCTAAGG
M. pneumoniae	GTAAGGTGATGATATATGTGGCGACACCTGCCCGTGGCCAGAGGTCAGGAGGTTGTTAGGCTAGTTTACTAGCTGAAGCTTCTAATTAAGCCCTGGTGAACGGCGGCCGTAACCTATACGGTCTCTAAGG
M. pulmonis	GCAAGACGATATATGTGGCGACACCTGCCCGTGGCCAGAGGTCAGGAGGTTGTTAGGCTAGTTTACTAGCTGAAGCTTCTAATTAAGCCCTGGTGAACGGCGGCCGTAACCTATACGGTCTCTAAGG
Bacillus cereus	GTAAGGCGAAGTATATGTGGCGACACCTGCCCGTGGCCAGAGGTCAGGAGGTTGTTAGGCTAGTTTACTAGCTGAAGCTTCTAATTAAGCCCTGGTGAACGGCGGCCGTAACCTATACGGTCTCTAAGG
M. capricolum	GCAAGACGATATATGTGGCGACACCTGCCCGTGGCCAGAGGTCAGGAGGTTGTTAGGCTAGTTTACTAGCTGAAGCTTCTAATTAAGCCCTGGTGAACGGCGGCCGTAACCTATACGGTCTCTAAGG
M. conjunctivae	GCAAAACGATATATGTGGCGACACCTGCCCGTGGCCAGAGGTCAGGAGGTTGTTAGGCTAGTTTACTAGCTGAAGCTTCTAATTAAGCCCTGGTGAACGGCGGCCGTAACCTATACGGTCTCTAAGG
M. gallisepticum	GCAAGATGATGATATATGTGGCGACACCTGCCCGTGGCCAGAGGTCAGGAGGTTGTTAGGCTAGTTTACTAGCTGAAGCTTCTAATTAAGCCCTGGTGAACGGCGGCCGTAACCTATACGGTCTCTAAGG
M. genitalium	GTAAGGTGATGATATATGTGGCGACACCTGCCCGTGGCCAGAGGTCAGGAGGTTGTTAGGCTAGTTTACTAGCTGAAGCTTCTAATTAAGCCCTGGTGAACGGCGGCCGTAACCTATACGGTCTCTAAGG
M. hominis	GTAAGATGATGATATATGTGGCGACACCTGCCCGTGGCCAGAGGTCAGGAGGTTGTTAGGCTAGTTTACTAGCTGAAGCTTCTAATTAAGCCCTGGTGAACGGCGGCCGTAACCTATACGGTCTCTAAGG
M. hyopneumoniae	GTAAGGCGAAGTATATGTGGCGACACCTGCCCGTGGCCAGAGGTCAGGAGGTTGTTAGGCTAGTTTACTAGCTGAAGCTTCTAATTAAGCCCTGGTGAACGGCGGCCGTAACCTATACGGTCTCTAAGG
M. synoviae	GTAAGGTGATGATATATGTGGCGACACCTGCCCGTGGCCAGAGGTCAGGAGGTTGTTAGGCTAGTTTACTAGCTGAAGCTTCTAATTAAGCCCTGGTGAACGGCGGCCGTAACCTATACGGTCTCTAAGG



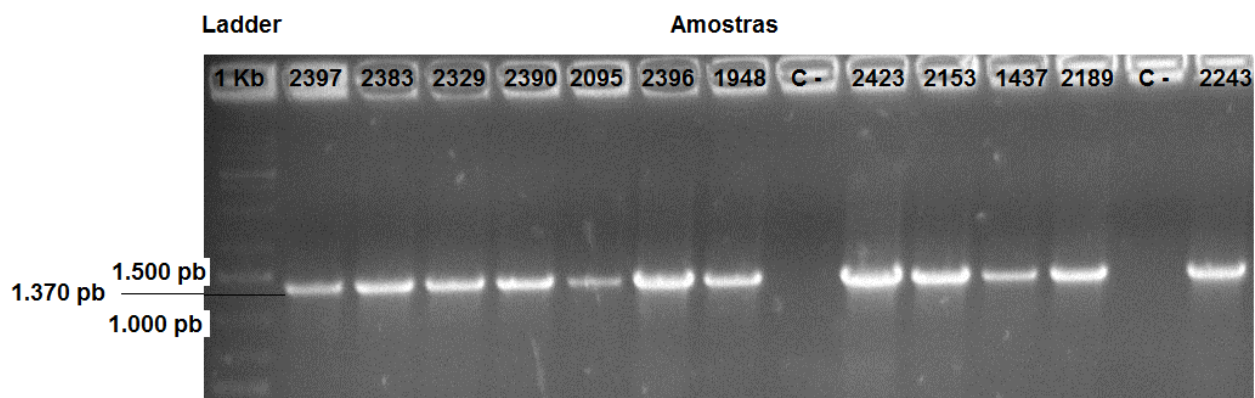
APÊNDICE 10 – ANÁLISE DESCRITIVA DOS VALORES HEMATOLÓGICOS ENCONTRADOS NOS CERVÍDEOS DO ESTUDO (SEPARADOS POR ESPÉCIE)

<i>Mazama nana</i>					
Variável	Número de animais	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Ht%	22	35	2.23897	31	40
Ppt	22	7,6	0,479267	6,9	8,8
Contagem de Células brancas	22	2.975	796,1326	1.225	4.700
<i>Blastocerus dichotomus</i>					
Variável	Número de animais	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Ht%	6	33,16667	5,776389	23	40
Ppt	6	8,133333	0,625033	7,2	8,9
Contagem de Células brancas	6	4.333,333	1250,067	2.650	5.850
<i>Mazama americana</i>					
Variável	Número de animais	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Ht%	3	36	4.582576	31	40
Ppt	3	7,7	0,964365	6,6	8,4
Contagem de Células brancas	3	3.716,667	832,6664	3.050	4.650

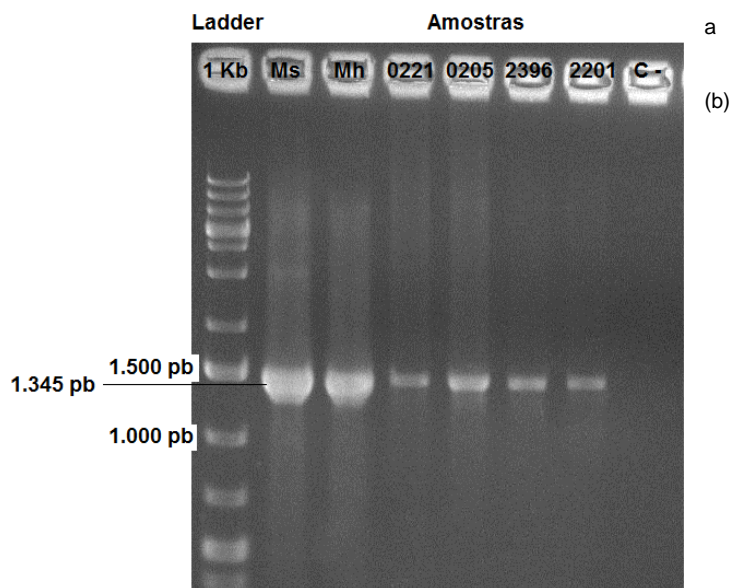
APÊNDICE 11 – ANÁLISE DESCRITIVA DOS DADOS DOS ANIMAIS E VALORES HEMATOLÓGICOS PARA AS TRÊS ESPÉCIES DE CERVÍDEOS ESTUDADAS (análise preparada para realizar a subsequente análise dos fatores de risco e alterações hematológicas associadas à infecção).

Variável	Categoria	Frequência	Porcentagem	Cumulativo
<b>Espécies</b>				
	<i>Blastocerus dichotomus</i>	6	19.35	19.35
	<i>Mazama nana</i>	22	70.97	90.32
	<i>Mazama americana</i>	3	9.68	100
<b>Sexo</b>				
	Machos	16	51.61	51.61
	Fêmeas	15	48.39	100
<b>Ticks</b>				
	Ausente	22	70.97	70.97
	Presente	9	29.03	100
<b>Anemia</b>				
	Anêmico	11	35.48	35.48
	Não anêmico	20	64.52	100
<b>Hematócrito</b>				
	Normal	19	61.29	61.29
	Alterado	12	38.71	100
<b>Contagem de células Branças</b>				
	Normal	24	77.42	77.42
	Alterado	7	22.58	100
<b>Total</b>		31	100	

APÊNDICE 12 – IMAGEM DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS PARA O SEQUENCIAMENTO DE HEMOPLASMAS.



(a) Imagem dos produtos amplificados do gene 16S rRNA de hemoplasma para serem purificados e sequenciados. Amostras 2397 a 2243: DNA de cervídeos brasileiros positivos para *M. ovis*; Controle negativo (C -): água.



(b) Imagem dos produtos amplificados do gene 23S rRNA de hemoplasma para serem purificados e sequenciados. Amostra Ms: DNA de porco infectado com *M. suis*; Amostra Mh: DNA de gato infectado com *M. haemofelis*; Amostras 0221 a 2201: DNA de cervídeos brasileiros positivos para *M. ovis*; Controle negativo (C -): água.

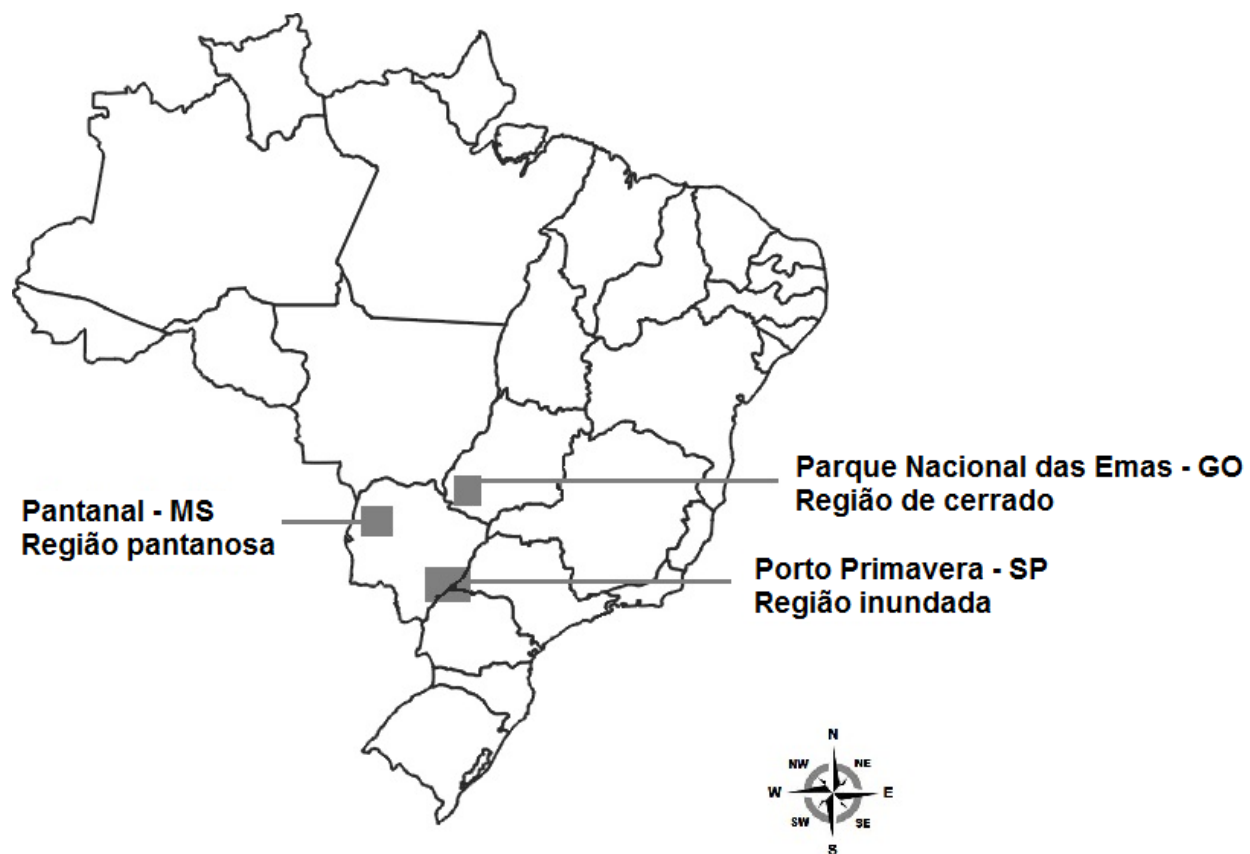


APÊNDICE 14 – MATRIX DE DISTÂNCIAS ENTRE AS SEQUÊNCIAS DE HEMOPLASMAS OBTIDAS DAS AMOSTRAS TESTADAS E DEMAIS MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS E NÃO HEMOTRÓPICOS PARA O GENE 23S rRNA.

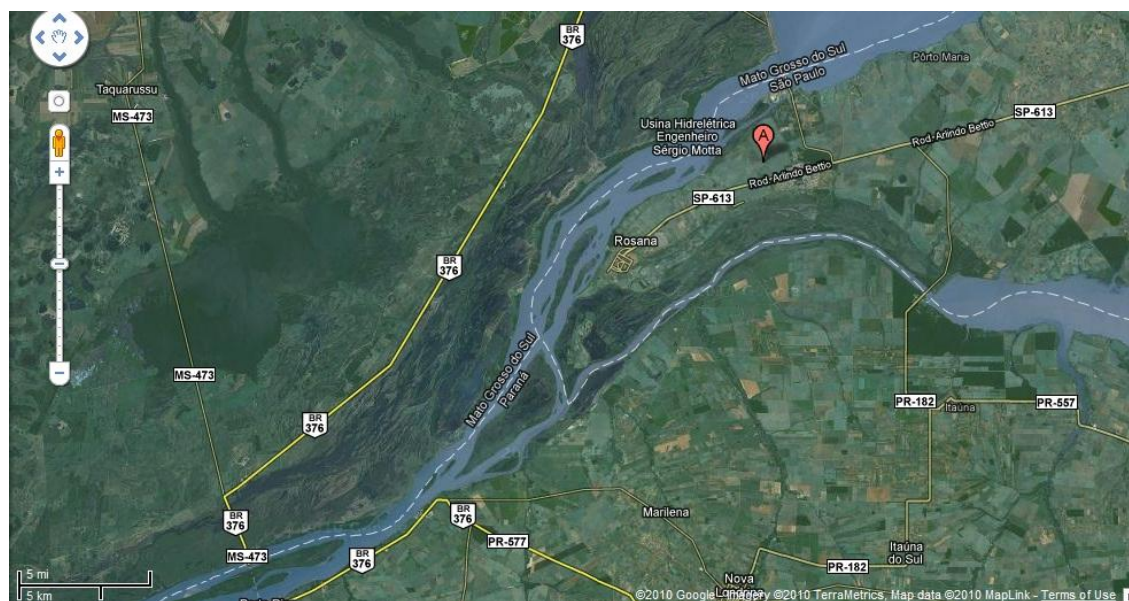
M4.1 (Beta 3): Pairwise Distances (C:\Users\laura\Desktop\bla.meg)																		
File	Display	Average	Caption	Help														
		(A,B)																
1. Isolate 1585																		
2. Isolate 0221	0.092																	
3. Uncultured clone Deer-Fawr	0.089	0.020																
4. M. suis	0.107	0.113	0.111															
5. M. haemofelis	0.250	0.240	0.241	0.239														
6. Mycoplasma sp. CLS	0.110	0.127	0.124	0.097	0.264													
7. M. hyorhinis	0.387	0.402	0.395	0.384	0.357	0.388												
8. M. mycoides	0.356	0.389	0.390	0.377	0.329	0.366	0.265											
9. M. penetrans	0.312	0.332	0.325	0.302	0.278	0.324	0.328	0.256										
10. M. pneumoniae	0.318	0.327	0.321	0.305	0.300	0.313	0.312	0.284	0.222									
11. M. pulmonis	0.404	0.422	0.405	0.399	0.376	0.405	0.129	0.277	0.319	0.307								
12. Bacillus cereus	0.431	0.439	0.422	0.423	0.401	0.426	0.334	0.261	0.321	0.329	0.309							
13. M. capricolum	0.359	0.396	0.394	0.378	0.330	0.367	0.265	0.008	0.255	0.289	0.273	0.257						
14. M. conjunctivae	0.409	0.420	0.409	0.401	0.388	0.409	0.060	0.283	0.349	0.332	0.161	0.341	0.283					
15. M. gallisepticum	0.314	0.325	0.327	0.304	0.280	0.314	0.323	0.273	0.195	0.117	0.298	0.338	0.268	0.343				
16. M. genitalium	0.323	0.331	0.325	0.313	0.298	0.320	0.312	0.290	0.225	0.016	0.310	0.327	0.293	0.337	0.121			
17. M. hominis	0.377	0.390	0.378	0.396	0.375	0.396	0.146	0.298	0.300	0.313	0.131	0.310	0.297	0.155	0.308	0.324		
18. M. hyopneumoniae	0.416	0.415	0.411	0.414	0.404	0.431	0.101	0.298	0.353	0.344	0.172	0.354	0.295	0.069	0.357	0.340	0.177	
19. M. synoviae	0.432	0.442	0.436	0.429	0.401	0.443	0.166	0.299	0.333	0.325	0.137	0.337	0.303	0.173	0.338	0.325	0.170	0.202

## APÊNDICE – CAPÍTULO 3

### APÊNDICE 1 – MAPA MOSTRANDO A LOCALIZAÇÃO DAS TRÊS REGIÕES ESTUDADAS



### APÊNDICE 2 – IMAGEM DE SATÉLITE DA LOCALIZAÇÃO DA USINA HIDRELÉTRICA DE PORTO PRIMAVERA (SÉRGIO MOTTA)



FONTE: GOOGLE IMAGERY, 2010.



APÊNDICE 3 - MATRIX DE DISTÂNCIAS ENTRE AS SEQUÊNCIAS DE HEMOPLASMAS OBTIDAS DAS AMOSTRAS TESTADAS E  
DEMAIS MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS E NÃO HEMOTRÓPICOS PARA O GENE 16S rRNA.

M4.1 (Beta 3): Pairwise Distances (C:\Users\laura\Desktop\artigo Barbant\alignent and figures 09.08\barbanti16S +dichotomae+ pneumoniae.meg)

File Display Average Caption Help

(A,B) 0.0 0.00 0.001 0.005 0.01 0.05 0.1 0.5 1 5 10 50 100

XL CSV PDF TXT

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1. Uncultured deer FJ824847																							
2. suis AF029394	0.094																						
3. wenyoni AF016546	0.047	0.089																					
4. canis AF197337	0.222	0.225	0.217																				
5. felis U95297	0.223	0.223	0.215	0.006																			
6. muris U82963	0.229	0.230	0.223	0.136	0.141																		
7. coccoides AY171918	0.213	0.227	0.207	0.105	0.106	0.115																	
8. tuicensis AY831867	0.218	0.214	0.211	0.122	0.119	0.105	0.079																
9. haematoparvum AY383241	0.080	0.092	0.079	0.228	0.231	0.221	0.206	0.206															
10. haemolanae AF306346	0.073	0.079	0.069	0.211	0.213	0.211	0.204	0.204	0.071														
11. haemonirutum U88564	0.093	0.104	0.088	0.221	0.223	0.210	0.203	0.201	0.048	0.080													
12. kahanei AF338269	0.098	0.092	0.107	0.214	0.219	0.213	0.208	0.215	0.088	0.086	0.090												
13. ovis AF338268	0.011	0.089	0.042	0.219	0.219	0.227	0.209	0.217	0.075	0.069	0.080	0.099											
14. pneumoniae M29061	0.318	0.319	0.307	0.246	0.252	0.273	0.247	0.257	0.315	0.300	0.289	0.283	0.313										
15. erythroidelphis AF178676	0.085	0.100	0.093	0.223	0.223	0.244	0.224	0.240	0.094	0.101	0.107	0.097	0.084	0.323									
16. Mycoplasma ovis isolate Mo-Hu-1-05.2007	0.010	0.091	0.043	0.218	0.218	0.229	0.208	0.218	0.077	0.069	0.080	0.099	0.003	0.315	0.084								
17. Mycoplasma sp. Sika99	0.042	0.093	0.042	0.218	0.218	0.218	0.204	0.212	0.084	0.074	0.092	0.097	0.041	0.307	0.086	0.042							
18. B86 isolado 1	0.006	0.092	0.044	0.219	0.219	0.229	0.209	0.217	0.079	0.070	0.094	0.098	0.010	0.319	0.086	0.008	0.043						
19. B62 isolado 2	0.039	0.093	0.039	0.218	0.220	0.223	0.205	0.211	0.082	0.065	0.091	0.093	0.037	0.309	0.090	0.038	0.020	0.038					
20. Candidatus dichotomae	0.050	0.087	0.062	0.212	0.212	0.221	0.203	0.200	0.072	0.060	0.087	0.099	0.049	0.305	0.089	0.050	0.070	0.052	0.061				
21. B88 isolado 3	0.049	0.089	0.060	0.200	0.200	0.216	0.194	0.196	0.073	0.059	0.088	0.101	0.046	0.303	0.088	0.045	0.068	0.047	0.060	0.009			
22. Candidatus Mycoplasma haemocervae Sika15	0.012	0.093	0.041	0.214	0.214	0.222	0.208	0.216	0.077	0.067	0.089	0.101	0.013	0.314	0.087	0.010	0.042	0.011	0.040	0.054	0.048		
23. Candidatus Mycoplasma haemovis isolate C.	0.029	0.107	0.062	0.239	0.240	0.250	0.229	0.245	0.097	0.090	0.111	0.117	0.020	0.341	0.101	0.019	0.060	0.027	0.056	0.071	0.065	0.029	

APÊNDICE 4 - MATRIX DE DISTÂNCIAS ENTRE AS SEQUÊNCIAS DE HEMOPLASMAS OBTIDAS DAS AMOSTRAS TESTADAS E  
DEMAIS MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS E NÃO HEMOTRÓPICOS PARA O GENE 23S rRNA.

M4.1 (Beta 3): Pairwise Distances (C:\Users\laura\Desktop\artigo Barbant\alignmet and figures 09.08\barbant23S09.30 w.meg)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1. Uncultured clone Deer-Fawn																					
2. M. suis	0.109																				
3. M. haemofelis	0.239	0.239																			
4. Mycoplasma sp. CLS	0.123	0.097	0.268																		
5. M. hyorhinis	0.395	0.385	0.361	0.393																	
6. M. mycoides	0.395	0.379	0.334	0.372	0.266																
7. M. penetrans	0.322	0.299	0.272	0.322	0.327	0.255															
8. M. pneumoniae	0.319	0.310	0.301	0.320	0.313	0.287	0.217														
9. M. pulmonis	0.401	0.404	0.380	0.413	0.130	0.278	0.320	0.310													
10. Bacillus cereus	0.425	0.425	0.406	0.426	0.336	0.262	0.319	0.331	0.309												
11. M. capricolum	0.398	0.379	0.334	0.372	0.268	0.008	0.254	0.290	0.275	0.257											
12. M. conjunctivae	0.410	0.406	0.396	0.417	0.059	0.287	0.350	0.335	0.162	0.343	0.286										
13. M. gallisepticum	0.321	0.304	0.277	0.319	0.326	0.272	0.189	0.117	0.305	0.339	0.268	0.346									
14. M. genitalium	0.321	0.316	0.297	0.326	0.314	0.292	0.220	0.016	0.314	0.328	0.296	0.339	0.123								
15. M. hominis	0.376	0.401	0.384	0.402	0.147	0.304	0.299	0.315	0.130	0.312	0.303	0.159	0.310	0.325							
16. M. hyopneumoniae	0.410	0.419	0.409	0.439	0.102	0.301	0.353	0.346	0.175	0.356	0.300	0.070	0.361	0.343	0.179						
17. M. synoviae	0.439	0.436	0.407	0.454	0.162	0.304	0.333	0.327	0.135	0.343	0.306	0.172	0.339	0.326	0.172	0.202					
18. Isolate B62 23S	0.066	0.117	0.245	0.115	0.410	0.393	0.326	0.330	0.427	0.450	0.397	0.416	0.321	0.334	0.406	0.430	0.452				
19. B88 23S overlap	0.086	0.102	0.247	0.102	0.391	0.365	0.319	0.319	0.408	0.439	0.368	0.410	0.308	0.323	0.388	0.415	0.450	0.096			
20. B86 23S overlap	0.017	0.110	0.239	0.125	0.405	0.396	0.329	0.327	0.420	0.440	0.402	0.419	0.321	0.330	0.388	0.416	0.444	0.066	0.082		
21. Candidatus Mycoplasma dichotomae	0.087	0.108	0.253	0.108	0.389	0.363	0.312	0.318	0.402	0.434	0.364	0.411	0.311	0.322	0.377	0.416	0.441	0.103	0.025	0.090	



## **ANEXOS**

ANEXO 1 – PÔSTER APRESENTADO NO AMERICAN SOCIETY FOR VETERINARY CLINICAL PATHOLOGY ANNUAL MEETING, October 30-November 3, 2010, Baltimore, Maryland, USA.

ANEXO 2 – ARTIGO SUBMETIDO NA REVISTA VETERINARY MICROBIOLOGY

ANEXO 3 – ARTIGO SUBMETIDO NA REVISTA JOURNAL OF WILDLIFE DISEASES

## ABSTRACT

[illegible]

## INTRODUCTION

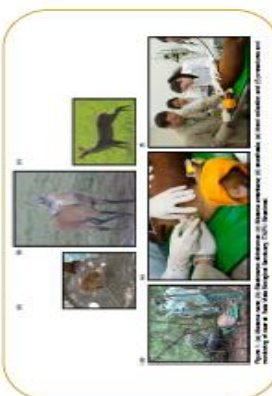
Hemiparasitic hemipterans are rapid, mobile and fast evolving taxa and therefore the ideal system for a general molecular approach to understanding the evolution and speciation of the neotropical taxa of several neotropical systems. Formerly known as members of the Pentatomidae family, M. ulmi was reclassified in the genus *Microstigmus* based on 18S rDNA sequence data. Although new data and gaps are considered the main focus of M. ulmi, the genus *Microstigmus* was recently divided in white-bellied drier and wetter. Wetland species may encompass the acute or chronic course of disease transmitting the infection in trees. Organisms are not frequently found in the blood of the clinically infected animals. It is still necessary to use molecular biology to find the transmission of *Microstigmus* with the first steps and

## MATERIALS AND METHODS

Whole blood samples of 22 captive *Mus mus* and 4 *Mus mus* *mus* and 4 *Mus mus* *mus* were collected from the Bala Vela Wildlife Sanctuary, Dept. of Forest, Tamil Nadu, India, were collected. The animal handling and sample collection were approved by the Institutional Institute for the Environment and the Renewable Resources (Protocol 22/96-1/22/11/2009).

Immunologic analyses (blood smear, TTP, PCV and WBC) were performed manually.

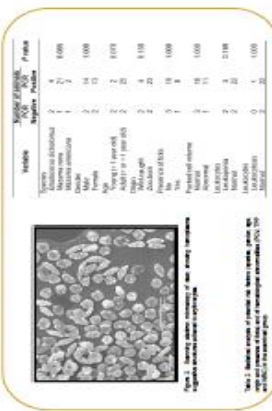
Blood samples were fixed in alcohol/acetic 2% and prepared for scanning electron microscopy.



## RESULTS

None of the Giemsa stained blood smears showed convincing evidence of hemoplasma presence. One M. ota positive sample was found suggestive of hemoplasma in the scanning electron microscopy.

2152 samples were positive for *Agaveactinomyces* genus.  
2171 samples were positive for *M. crinita* genus.  
Sequencing of 16S rDNA genes  
26 sequences showed 85-94.9% identity to *M. crinita* of strain (JF529258) and 98.5-99.4% identity to *M. crinita* of strain (JF529259).  
One strain (1949) from *M. abstrusus* (Hasek et al. 2004) was identified as *M. abstrusus* (Hasek et al. 2004) with only 95.1% and 95% identity to the 16S rDNA genes of *M. crinita* of strain (JF529258) of the strain, respectively.  
Sequencing of 23S rDNA genes  
Incubate 12211 had 97.8% identity to *M. crinita* of strain (JF529258) and 98.4% identity to *M. crinita* of strain (JF529259).  
Incubate 1585 showed only 90.4% identity to *M. crinita* of strain (JF529258).



## DISCUSSION / CONCLUSIONS

Study American serotype III isolates. M. mares and M. anseriformis are currently isolated with serotypes alpha, including strains of M. mares and a novel isolate for which the authors propose the name *Candidatus Myxobolus debilis*.

The use of M. mares as a template and its high level of identity with *Myxobolus* infection by *Candidatus Myxobolus debilis* is much more frequent and may be associated with clinical signs.

We found that oral cross-protection in a herd, M. mares may spread easily among the deer, and that the infection seems to persist within the herd.

Additional studies are needed to evaluate the pathogenicity and transmission of these deer hematozoans.

## REFERENCES

- [illegible]

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Division for the opportunity to pursue these studies and the staff for their invaluable help in the field activities. Dr. Guzman was sponsored by a fellowship from FondoCoE awarded for his Masters in the Graduate College of Cellular and Molecular Biology at the Federal University of Minas. Finally, it is through the laboratory and other support provided at the University of Purdue that this project has come to fruition.

Manuscript Number:

Title: *Mycoplasma ovis* and a novel hemotropic mycoplasma in captive cervids: phylogeny, prevalence, and analysis of potential risk factors for infection

Article Type: Research Paper

Keywords: *Mycoplasma ovis*; deer; 23S rDNA; captive; wild animals; hemoplasma

Corresponding Author: Ms. Ana Laura Grazziotin,

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Parana

First Author: Ana Laura Grazziotin

Order of Authors: Ana Laura Grazziotin; Andrea Santos, D.V.M., Ph.D.; Ana Marcia Guimaraes, D.V.M., MSc.; Ahmed Mohamed, D.V.M., MSc.; Zalmir Cubas, D.V.M., MSc; Marcos Oliveira, Biol.; Leonilda Santos, Farmac. Bioch.; Wanderlei Moraes, D.V.M.; Rafael Vieira, D.V.M., MSc.; Lucelia Donatti, Biol., PhD; Ivan Barros Filho, D.V.M., Ph.D.; Alexander Biondo, D.V.M., PhD; Joanne Messick, VMD, PhD, ACVP

***Mycoplasma ovis* and a novel hemotropic mycoplasma in captive cervids: phylogeny, prevalence, and analysis of potential risk factors for infection**

Ana Laura Grazziotin <sup>a</sup>, D.V.M., Andrea Pires Santos <sup>b</sup>, D.V.M., Ph.D., Ana Marcia Sa Guimaraes <sup>b</sup>, D.V.M., MSc., Ahmed Mohamed <sup>b</sup>, D.V.M., MSc., Zalmir Silvino Cubas <sup>c</sup>, D.V.M., MSc., Marcos Jose de Oliveira <sup>c</sup>, Biol., Leonilda Correia dos Santos <sup>c</sup>, Farmac. Bioch., MSc., Wanderlei de Moraes <sup>c,d</sup>, D.V.M., Rafael Felipe da Costa Vieira <sup>e</sup>, D.V.M., MSc., Lucelia Donatti <sup>f</sup>, Biol., Ph.D., Ivan Roque de Barros Filho <sup>a</sup>, D.V.M., Ph.D., Alexander Welker Biondo <sup>a</sup>, D.V.M., Ph.D, Joanne Belle Messick <sup>b,\*</sup>, V.M.D., Ph.D., ACVP.

<sup>a</sup> Department of Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários, 1450, Curitiba, PR80035-050, Brazil.

<sup>b</sup> Department of Comparative Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Purdue University, 725 Harrison Street, West Lafayette, IN47907-2027, USA.

<sup>c</sup> Bela Vista Biological Sanctuary, ITAIPU Binational, Rua Teresina, 62, Foz do Iguaçu, PR85856-970, Brazil.

<sup>d</sup> Faculdade Anglo-Americano de Foz do Iguaçu, Avenida Paraná, 5661, Foz do Iguaçu, PR85868-030

<sup>e</sup> Department of Preventive Veterinary Medicine, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR445 Km 380, Londrina, PR86051-990, Brazil.

<sup>f</sup> Department of Cellular Biology, Biology Sciences, Universidade Federal do Paraná, Avenida Cel. Francisco H. dos Santos, s/n., Curitiba, PR81531-980, Brazil.

\* Correspondent author: Dr. Joanne Belle Messick. Mailing address: Department of Comparative Pathobiology, Purdue University School of Veterinary Medicine, VPRB Building, 725 Harrison Street, West Lafayette, IN 47907-2027, USA. Phone: 1-765-471-9532. Email: jmessic@purdue.edu

## Abstract

Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) are bacteria that attach to red blood cells of mammals, leading to acute and/or subclinical disease in infected animals. It has been suggested that *Mycoplasma ovis*, a hemoplasma that infects sheep and goats worldwide, may also infect deer. The aim of this study was to evaluate whether South American deer are infected with *M. ovis* and analyze risk factors and hematological abnormalities associated with infection. EDTA-anticoagulated blood samples from a herd of 32 captive South American deer were collected. Hematologic parameters were evaluated followed by DNA extraction, PCR amplification of 16S and 23S rRNA genes, and sequencing of products. By *M. ovis* PCR, 27/31 (87%) were positive, including 21/22 *Mazama nana*; 2/3 *Mazama americana* and 4/6 *Blastocerus dichotomus*. Sequencing of the nearly entire 16S rRNA gene of 26/27 positive samples showed 98.2-98.8% identity to *M. ovis* of sheep (GenBank, AF338268) and 98.6-99.4% identity to *M. ovis*-like of a fawn (FJ824847); the 23S rRNA genes from one of these isolates and the fawn's had 97.7% identity. The remaining isolate had just 95.1% identity to 16S rRNA gene of *M. ovis* (AF338268) and only 89.4% identity to the 23S rRNA gene of the fawn's *M. ovis*. Potential risk factors (species, gender, age, animal origin and presence of ticks) as well as the presence of hematologic abnormalities were not associated with hemoplasma infection in the studied deer population ( $P > 0.05$ ). However, clinical and molecular data suggest that the divergent isolate is a novel, possibly more pathogenic, hemoplasma species infecting deer.

Keywords: *Mycoplasma ovis*, deer, 23S rDNA, captive, wild animals, hemoplasma.

## 1. Introduction

Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) are small, uncultivable and cell wall-less bacteria that parasitize the red blood cells of several mammal species (Messick, 2004). Previously divided in two genera (*Haemobartonella* and *Eperythrozoon*) in the Anaplasmataceae family, they were reclassified in the genus *Mycoplasma* based on 16S rRNA gene sequence data (Neimark et al., 2001). Within this new group, *Mycoplasma ovis* (formerly *Eperythrozoon ovis*) has been described in domestic ruminants (sheep and goats) causing mild to severe anemia, weight loss, ill thrift, and high mortality particularly in young animals (Philbey et al., 2006). Adults are commonly chronically infected, usually in absence of clinical signs (Daddow, 1981), and may act as a source of infection for others in the herd (Mason and Staham, 1991). The

natural means of bacterium transmission is not well understood, but ticks (Nikol'skii and Splipchenko, 1969) and mosquitos (Daddow, 1980) are implicated as vectors for the ovine hemoplasma.

Although sheep and goats are considered the main hosts of *M. ovis*, the epidemiology of the bacteria in wild ruminants has yet to be fully established. Using PCR, *M. ovis* infection was recently detected in white-tailed deer (Boes et al, unpublished) and reindeer (Stoffregen et al., 2006). Some of these animals had signs of acute infection and organisms were observed on stained blood smears, whereas other animals were apparently healthy despite infection. Organisms were infrequently seen in blood of these chronically infected animals (Boes et al, unpublished; Stoffregen et al., 2006). It is still unclear what role infected deer might play in the transmission of hemoplasmas within the herd and to sheep and goats.

Seven native deer species have been described in Brazil (Ministério do Meio Ambiente, 2008), which include the *Blastocerus dichotomus*, *Mazama nana*, *M. americana*, *M. gouazoubira*, *M. bororo*, *Odocoileus virginianus* and *Ozotocerus bezoarticus*. According to CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora), two of these species (*B. dichotomus* and *O. bezoarticus*) are threatened with extinction, while there is inadequate information about the other species for this assessment (CITES, 2010). In addition, little is known about the susceptibility of these animals to disease and their role as reservoirs of infectious agents. There are no studies investigating hemoplasma infection in the Brazilian deer. Thus, the aim of this study was to 1) determine the prevalence of hemotropic mycoplasmas in captive South American cervids maintained at a wildlife sanctuary, 2) perform phylogenetic analysis of hemoplasma isolates, and 3) evaluate risk factors and hematological abnormalities associated with the infection.

## **2. Methods**

### *2.1. Animals and blood collection*

A total of 32 deer were sampled, including 22 *M. nana* (Dwarf Brocket deer), 4 *M. americana* (Red Brocket deer) and 6 *B. dichotomus* (Marsh deer). These deer are maintained in captivity at Bela Vista Biological Sanctuary, Itaipu Binational Dam, in Foz do Iguaçu, Parana State, Brazil, as part of a program to ensure the conservation of threatened animal species. The sampling was done in conjunction to a health status evaluation of all animals. Within the group, 16 were males and 16 females, 28 were adults (equal or above 1 year old) and 4 were fawns. Deer were initially sedated with blowguns using darts followed by anesthesia using 2% xylazine

chloridrate (0.5 mg/kg) and 10% ketamine chloridrate (7 mg/kg) for *M. nana* and *M. americana* and 20% zolazepam (3 mg/kg) and 2% xylazine chloridrate (0.5 mg/kg) for *B. dichotomus*. EDTA blood samples were collected by jugular venipuncture and stored at 4 °C for 2 h until hematological analyses were performed. Blood smears were prepared from EDTA anticoagulated blood, stained with Giemsa, and examined by high magnification light microscopy (1,000X). Hematological values were determined as follows: white blood cell count (WBC) was manually performed using a hemocytometer chamber, the packed cell volume (PCV) was measured by routine centrifugation and total plasma protein (TPP) was measured by refractometry (Santos, 1999). The hematological reference values were obtained from previous deer studies (Santos, 1999; Szabo et al., 2005) and from the International Species Information System (ISIS, 2002) (Table 1). The following data also was collected: species, gender, age, animal origin (wild-caught or zoo-born) and presence of ticks.

This study has been approved by Itaipu Binational and Brazilian Institute of the Environment and Renewable Resources (protocol number 22,158 on 12/Nov/2009).

## 2.2. DNA extraction

DNA was extracted from 200 µL of whole blood samples using the Quick-gDNA<sup>TM</sup> MiniPrep Kit (Zymo Research Corp., Orange, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. To monitor for cross-contamination, ultrapure water was extracted as negative control in each batch of 10 blood samples.

## 2.3. PCR for housekeeping gene

Conventional PCR of a housekeeping gene, kappa-casein, was used to confirm the presence of amplifiable DNA in all extracted samples. A 361 base pair (bp) sequence of the kappa-casein gene of the deer was specifically amplified as previously described (Otaviano, 2006) (Table 2). PCR products were separated by electrophoresis in a 1.5% agarose gel for 1 h at 100V and subsequently stained with ethidium bromide. Gels were photographed using a 312 nm UV light transilluminator and Epi Chem II Darkroom (UVP, Inc., Upland, CA, USA) imaging system.

## 2.4. PCR for *Mycoplasma ovis*

A *M. ovis* PCR assay was performed on all deer samples using a previously described protocol (Neimark et al., 2004). A positive control for *M. ovis* from a naturally infected white-tailed deer was used in all reactions while water was used as negative control.

## 2.5. PCR for 16S rRNA and 23S rRNA genes and sequencing

A set of primers was designed to amplify a product of 1,370 bp of the 16S rRNA gene of *M. ovis* (GenBank accession number AF338268). The 25 µL PCR mixture contained 5 µL of 1X PCR buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 50 mM NaCl), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 10 pmol of each primer, 1.25 U of GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega Corporation, Madison, WI, USA), water and 5 µL of template DNA. The cycling conditions consisted of: a 4 min denaturation at 95 °C, followed by 39 cycles of 94 °C for 1 min, 51.6 °C for 30 sec, and 72 °C for 1 min and 30 sec with a final extension at 72 °C for 5 min and cooling to 4 °C (PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Inc., Waltham, MA). The amplified products were separated by electrophoresis as described above and purified from the gel using a commercial kit (Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit, Zymo Research Corp.). Products of the 16S rRNA gene were directly sequenced in both directions at the Purdue Genomics Core Facility, West Lafayette, IN.

Based on the 23S rRNA genes of non-hemotropic and hemotropic *Mycoplasma* spp., including *M. suis* and *M. haemofelis*, a set of primers was designed to amplified a 1,345 bp fragment of this gene. The content of the PCR mixture for amplification of the 23S rRNA gene was the same described above. Cycling conditions consisted of a 2 min denaturation at 95 °C followed by 35 cycles of 94 °C for 1 min, 52 °C for 45 sec, and 72 °C for 1 min and 30 sec with a final extension of 72 °C for 5 min and a cooling at 4 °C. Purified PCR products were cloned using pGEM-T® Easy Vector (Promega Corporation, Madison, WI, USA) for 23S rRNA. The cloned products were purified using QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) and then sequenced in both directions. The nucleotide sequences of hemoplasmas from these deer were submitted to the GenBank databases.

## 2.6. Phylogenetic analyses

The 16S rRNA and 23S rRNA gene sequences obtained in this study were compared to those deposited in GenBank databases using Basic Local Alignment Search Tool for nucleotides (BLASTn) (Altschul et al., 1990) and aligned using CLUSTAL W software (Thompson et al., 1994). Phylogenetic trees were created for both genes in MEGA version 4 software (Tamura et al., 2007) by neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) using a distance matrix that was corrected for nucleotide substitutions based on Kimura 2-parameter model (Kimura, 1980). The dataset was resampled 1,000 times to generate bootstrap values.



## 2.7. Statistical analysis

All parameters were compiled in Excel spreadsheet and analyzed using standard statistical software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Hematologic findings were categorized as normal/abnormal based on published reference ranges for each species. Data from cervid species, *M. americana* and *B. dichotomus*, were combined into a single group due to low sample size. Statistical Univariate analysis for association between mycoplasma infection and potential risk factors (species, gender, age, origin and presence of ticks), hematological abnormalities (PCV, WBC and TPP) was conducted using Chi-square or Fisher's exact (when appropriate) tests. Results were considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

## 2.8. Accession numbers for 16S rRNA and 23S rRNA gene sequences

Sequences of hemoplasmas from deer were submitted to GenBank. The accession numbers are: (a) for 16S rRNA gene: HQ197742 (isolate 2189), HQ197743 (isolate 2238), HQ197744 (isolate 2167), HQ197745 (isolate 1437), HQ197746 (isolate 0221), HQ197747 (isolate 1585), HQ197748 (isolate 2385), HQ197749 (isolate 2404) and (b) for 23S rRNA gene: HQ197750 (isolate 1585), HQ197751 (isolate 0221) and HQ197752 (*Mycoplasma* sp. Deer-Fawn).

# 3. Results

## 3.1. Prevalence of hemotropic mycoplasmas

The housekeeping gene, kappa-casein, was successfully amplified from all samples except for one, a female *M. americana*. Thus, this negative sample was excluded from the study (n=31). A total of 27/31 (87%) animals were positive in the *M. ovis* PCR assay, including 21/22 *M. nana*, 2/3 *M. americana* and 4/6 *B. dichotomus*.

## 3.2. Molecular characterization of hemotropic mycoplasmas

Sequencing of the nearly entire 16S rRNA genes was successful for the 27 positive samples. Twenty-six of these sequences showed 98.2-98.8% identity to *M. ovis* of sheep (AF338268) and 98.6-99.4% identity to *M. ovis*-like of a deer fawn (FJ824847). In contrast, one isolate (1585) from a *B. dichotomus* (female, > 15 years old) was only 95.1% and 95% identical to the 16S rRNA gene of *M. ovis* of sheep and of the deer fawn, respectively. This isolate branched away from the *M. ovis*/*M. wenyonii* cluster on the phylogenetic tree (Fig. 1), while the 7 other representative isolates (2189, 2238, 2167, 1437, 0221, 2385 and 2404) appeared closely related to *M. ovis* within the *M. suis* group. For each of the isolates having identical 16S rRNA gene sequences, one representative was included in the phylogenetic tree.

The 23S rRNA genes of isolates 0221, 1585 and *M. ovis* of the deer fawn were also sequenced. Isolate 1585 showed only 89.4% identity to *M. ovis* of the fawn, while the other isolate (0221) had 97.6% identity. The phylogenetic trees, relating the isolates to hemoplasmas and other mycoplasmas for 16S rRNA (data not shown) and 23S rRNA genes (Fig. 2) showed similar branching patterns/relationships among the isolates and *Mycoplasma* groups. The 23S rRNA gene of isolate 1585 branched away from the *M. ovis*/*M. wenyonii* cluster on the phylogenetic tree.

### 3.3. Risk factors and hematological abnormalities associated with infection

None of the variables evaluated were found to be significant risk factors ( $P > 0.05$ ) for hemoplasma infection in deer (Table 3). Hemoplasma PCR-positive status was not associated with species, gender, age, origin and presence of ticks. Hematological abnormalities (PCV, TPP and WBC) were also not associated with infection. Although 11/27 (40.8%) of the positive animals were anemic, this hematologic abnormality was not associated with the hemoplasma infection. In addition, no hemoplasma organisms were convincingly identified attached to erythrocytes on stained blood smears.

## 4. Discussion

This is the first characterization of two genetically distinct hemoplasmas in captive South American deer. While most isolates, based on both the 16S and 23S rRNA genes, had high sequence identity to *M. ovis*, a single divergent isolate (1585) was also identified. It has been suggested that two bacterial isolates would belong to different species if the identity in the 16S rRNA gene between them were less than 97% (Drancourt and Raoult, 2005). The high gene sequence identity (98.2-98.4%) to *M. ovis* for 26 of these isolates suggests that these are variant strains of *M. ovis* rather than a new hemoplasma species. While *M. ovis* was the best match to the 16S rRNA gene of isolate 1585, it had only 95.1% identity. The lower sequence identities for this isolate and divergent branching pattern seen in the phylogenetic tree of both genes, strongly support a novel hemoplasma species. Given that hemoplasmas typically contain only a single copy of this gene, sequencing of the 16S rRNA gene alone is likely to suffice for identification of species. There is no consensus in the literature about an acceptable cutoff value of 23S rRNA gene sequence identity for delineation of new bacterial species. Nevertheless, the finding that only 89.4% identity for the 23S rRNA gene was observed between isolate 1585 and *M. ovis* of the fawn, further strengthens the conclusion that isolate 1585 is a novel hemoplasma species. The clinical relevance of isolate 1585 is still unclear. However, it is of interest that this novel

hemoplasma was identified in the only deer that was clinically ill; the deer was anemic, showing clinical signs of weakness and lethargy at the time of blood collection.

In the present study, a 16S rRNA gene product was amplified in 87% of the blood samples from deer by conventional PCR for *M. ovis*. In North American cervids, natural infections were found in 77.7% (7/9) of white-tailed deer (Boes et al., unpublished) using the same *M. ovis* PCR assay described herein. Another report describing hemoplasma infection in anemic reindeer showed that 60% (9/15) of the animals tested by PCR were positive (Stoffregen et al., 2006). Likewise, a sheep herd that was tested by PCR in Argentina showed an 81% (9/11) prevalence of *M. ovis* (Aguirre et al., 2009). It is likely that the high prevalence of *M. ovis* in deer and sheep is related to its mode of transmission. Thus, ticks or other vectors, injuries related to animal-to-animal contact and handling, as well as vertical transmission might play a role in widespread infection of these species.

The risk factors for hemoplasma infection in cervids have not been previously reported. None of the putative risk factors examined for *M. ovis* in this study were associated with PCR detection of infection in the deer. There is a single molecular study evaluating risk factors for *M. ovis* infection in sheep, however these animals were also infected with *Anaplasma ovis* (Hornok, et al., 2009). The lack of statistical significance for factors analyzed in the present study may be due to the high prevalence of hemotropic mycoplasmas among deer. Thus, it is possible that if the sample size was larger, differences might be found.

Anemia is frequently seen in acute hemoplasmosis caused by *M. ovis* in sheep and goats. However, sheep may fail to show clinicopathologic signs of disease when chronically infected (Daddow et al., 1979; Brun-Hansen et al., 1997). In the present study, a relationship between anemia and hemoplasma infection was not identified. Despite anemia in 40.7% of the infected deer, all but 1 of these animals was clinically healthy. The ill deer, a *B. dichotomus*, was infected with the novel hemoplasma species as described above. Previous studies by Boes et al. (unpublished) also suggested that deer infected with hemoplasma often have no clinical signs of infection and are not anemic. Among nine reindeer positive by PCR (Stoffregen et al., 2006), six were anemic with organisms visible on blood smears, whereas three were asymptomatic with no organisms observed on blood smears. Thus, it remains unclear whether or not hemoplasmas may act as a primary pathogen under some circumstances in deer.

In conclusion, South American cervids (*B. dichotomus*, *M. nana* and *M. americana*) are commonly infected with hemoplasma species, including strains of *M. ovis* and a novel isolate for

which the authors propose the name ‘*Candidatus Mycoplasma dichotomae*’. The prevalence of *M. ovis* in these captive deer is high and clinically silent. However, infection by ‘*Candidatus Mycoplasma dichotomae*’ is much less frequent and may be associated with clinical signs. Our findings suggest that once present in a herd, *M. ovis* may spread easily among the deer, and that the infection seems to persist within the herd. Additional studies are needed to evaluate the pathogenicity and transmission of these deer hemoplasmas.

## **5. Acknowledgements**

The authors would like to thank Itaipu Binational for the opportunity to pursue these studies and the staff for their invaluable help in the field activities. Dr. Grazziotin was sponsored by a fellowship from Fundação Araucária for her Masters in the Graduate College of Cellular and Molecular Biology at the Federal University of Paraná. Finally, it is through the ample laboratory and other support provided at the University of Purdue that this project has come to fruition.

## **6. References**

1. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, .E. W., Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403–410
2. Aguirre, D. H., Thompson, C., Neumann, R. D., Salatin, A. O., Gaido, A. B., Torioni de Echaide, S. 2009. Brote de micoplasmosis clínica por *Mycoplasma ovis* en ovinos de Salta, Argentina. Diagnóstico clínico, microbiológico y molecular. *Rev. Arg. Microb.* 41: 212-214.[In Spanish]
3. Brun-Hansen, H., Gronstol, H., Waldeland, H., Hoff, B., 1997. *Eperythrozoon ovis* infection in a commercial flock of sheep. *Zentbl. Veterinarmed. B.* 44, 295-299.
4. CITES, Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. CITES Species Database. URL <http://www.cites.org/eng/resources/species.html>. Accessed in August 2010.
5. Daddow, K.N., 1979. The transmission of a sheep strain of *Eperythrozoon ovis* to goats and the development of a carrier state in the goats. *Aust. Vet. J.* 55, 605.
6. Daddow, K.N., 1980. *Culex annulirostris* as a vector of *Eperythrozoon ovis* infection in sheep. *Vet. Parasitol.* 7: 313-317.
7. Daddow, K.N., 1981. The duration of the carrier state of *Eperythrozoon ovis* infection in sheep (letter). *Aust. Vet. J.* 57, 49.

- 288 8. Drancourt, M., Raoult, D., 2005. Sequence-based identification of new bacteria: a  
289 proposition for creation of an orphan bacterium repository. J. Clin. Microbiol. 43, 4311-4315.
- 290 9. Hornok, S., Meli, M. L., Erdos, A., Hajtós, I., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R. 2009.  
291 Molecular characterization of two different strains of haemotropic mycoplasmas from a sheep  
292 flock with fatal haemolytic anaemia and concomitant *Anaplasma ovis* infection. Vet. Microb.  
293 136, 372-377.
- 294 10. ISIS, 2002. Reference for Physiological Values in Captive Wildlife, CD-ROM.  
295 International Species Inventory System, Apple Valley, Minnesota.
- 296 11. Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base  
297 substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16, 111-120.
- 298 12. Mason, R.W., Statham, P., 1991. Susceptibility of sheep and goats to *Eperythrozoon ovis*  
299 infection. Aust. Vet. J. 68, 116-117.
- 300 13. Messick, J.B., 2004. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new  
301 insights into pathogenic potential. Vet. Clin. Pathol. 33, 2-13.
- 302 14. Ministerio do Meio Ambiente, 2008. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de  
303 Extinção. Brasília:DF, 2v. 2008. 1420p.[In Portuguese]
- 304 15. Neimark, H., Johansson, K.-E., Rikihisa, Y., Tully, J.G., 2001. Proposal to transfer some  
305 members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with  
306 descriptions of `Candidatus Mycoplasma haemofelis`, `Candidatus Mycoplasma haemomuris`,  
307 `Candidatus Mycoplasma haemosuis` and `Candidatus Mycoplasma wenyonii`. Int. J. Syst.  
308 Evol. Microbiol. 51, 891-899.
- 309 16. Neimark, H., Hoff, B., Ganter, M., 2004. *Mycoplasma ovis* comb. Nov. (formely  
310 *Eperythrozoon ovis*), an epierythrocytic agent of haemolytic anaemia in sheep and goats. Int. J.  
311 Syst. Evol. Microb. 54, 365-371.
- 312 17. Nikol'skii, S.N., Slipchenko, S.N., 1969. Experiments in the transmission of  
313 *Eperythrozoon ovis* by the ticks *H. plumbeum* and *Rh. bursa*. Veterinariia. 5, 46.
- 314 18. Otaviano, A. R. 2006. Polimorfismo dos genes das caseínas e sua utilização na detecção  
315 de misturas de leite bovino bubalina. 2006. 82 p. Tese (Doutorado em Produção Animal) -  
316 Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista [In  
317 Portuguese].
- 318 19. Philbey, A.W., Barron, R.C.J., Gouden, A., 2006. Chronic eperythrozoonosis in and adult  
319 ewe. Vet. Records. 158, 662-664.

20. Saitou, N., Nei, M., 1987. The Neighbor-joining Method: A new method for Reconstructing Phylogenetic Trees<sup>1</sup>. Mol. Biol. Evol. 4, 406-425.
21. Santos, L.C., 1999. Laboratorio Ambiental. Editora Universitaria Eduninoeste, Cascavel, pp. 233-305.[In Portuguese]
22. Stoffregen, W.C., Alt, D.P., Palmer, M.V., Olsen, S.C., Waters, W.R., Stasko, J.A., 2006. Identification of haemycoplasma species in anemic reindeer (*Rangifer tarandus*). J. Wild. Dis. 42, 249-258.
23. Szabo, M. P. J., Matushima, E. R., Castro, M. B., Santana, D. A., Paula, C. D., Duarte, J. M. B. 2005. Hematology of free-living Marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) from Southeast Brazil. J. Zoo Wild. Med. 36: 463-469.
24. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24, 1596-1599.
25. Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weigh matrix choice. Nuc. Ac. Res. 22, 4673-4680.

## 7. Tables

Table 1. Reference values for studied deer species.

Table 2. Primers used for amplification of housekeeping, 16S rRNA and 23S rRNA genes.

Table 3: Statistical analysis of potential risk factors (species, gender, age, origin and presence of ticks) and of hematological abnormalities (PCV, TPP and WBC) in the examined group.

## 8. Figures

Figure 1. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the relationship of the deer hemoplasma isolates (1437, 2189, 2167, 2238, 2385, 0221 and 1585) to the other hemoplasma species using a neighbor joining method. Uncultured *Mycoplasma* sp. clone from deer fawn (FJ824847), *M. ovis* (AF338268), *M. wenyonii* (AF016546), 'Candidatus *M. erythroidelphus*' (AF178676), 'Candidatus *M. haemolamae*' (AF306346), *M. suis* (AF029394), 'Candidatus *M. haemtoparvum*' (AY383241), 'Candidatus *M. haemominutum*' (U88564), 'Candidatus *M. kahanei*' (AF338269), *M. haemocanis* (AF197337), *M. haemofelis* (FJ824847), *M. haemomuris* (U95297), *M. coccoides* (AY831867), 'Candidatus *M. turicensis*' (M29061) are shown. *M. pneumoniae* (M29061) was used as outgroup. Bootstrap percentage values are given at the nodes of the tree.

352 Figure 2. 23S rRNA gene sequence-based phylogenetic tree, indicating relationships of deer  
353 isolates (1585, 0221 and uncultured *Mycoplasma* sp. clone from deer fawn) and members of the  
354 genus *Mycoplasma* using a neighbor joining method. The 23S rRNA gene IDs retrieved from  
355 complete genome database for each sequence are: *M. hyorhinis* (9712697), *M. mycoides*  
356 (2744514), *M. pulmonis* (911080), *M. gallisepticum* (8999768), *M. pneumoniae* (876745), *M.*  
357 *penetrans* (1041297), *M. genitalium* (875271), *M. hominis* ( 8658487), *M. synoviae* (3564321),  
358 *M. capricolum* (3828641), *M. conjunctivae* (7989489), *M. hypneumoniae* (3570963), *M. suis*  
359 (ADWK01000001), *M. haemofelis* (Santos et al., unpublished. Genome project ID: 50029) and  
360 *Mycoplasma* sp. CLS (GU9050061). *Bacillus cereus* was used as outgroup for both trees.  
361 Numbers at nodes refer to bootstrap values.

<b>Manuscript #</b>	2011-01-007
<b>Current Revision #</b>	0
<b>Submission Date</b>	2011-01-11 04:14:24
<b><u>Current Stage</u></b>	Potential Reviewers Assigned
<b>Title</b>	Frequency of infection and molecular characterization of <i>Mycoplasma ovis</i> infection in free-ranging deer populations from Brazil
<b>Running Title</b>	Frequency and characterization of <i>M. ovis</i> infection in deer from Brazil
<b>Manuscript Type</b>	Short communications
<b>Special Section</b>	N/A
<b>Corresponding Author</b>	Ana Grazziotin (Universidade Federal do Parana)
<b>Contributing Authors</b>	Jose Barbanti , Matias Szabo , Andrea Santos , Ana Marcia Guimaraes , Ahmed Mohamed , Rafael Vieira , Ivan Filho , Alexander Biondo , Joanne Messick
<b>Abstract</b>	<p><i>Mycoplasma ovis</i> is a hemoplasma that may cause anemia and mortality in small ruminants. Our aim was to determine whether <i>M. ovis</i> infects various populations of free-ranging deer in Brazil. Buffy coat samples from 64 <i>Blastocerus dichotomus</i> from Porto Primavera, 18 <i>Ozotocerus bezoarticus</i> from Pantanal, and 21 <i>O. bezoarticus</i> from Emas National Park were tested. Using a <i>M. ovis</i>-PCR protocol on extracted DNA, 46/64 (71.9%) deer from Porto Primavera, 10/18 (55.6%) from Pantanal, and 4/21 (19%) from Emas National Park were positive, giving an overall frequency of 58.3% for hemoplasma infection in these wild deer. Sequencing and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene revealed 3 genetically distinct hemoplasma species in South American deer, including <i>M. ovis</i>, '<i>Candidatus Mycoplasma erythrocervae</i>' and '<i>Candidatus Mycoplasma dichotomae</i>'. Phylogenetic analysis of the 23S rRNA gene from selected isolates confirmed these relationships.</p>
<b>Assistant Editor</b>	Assigned
<b>Keywords</b>	<i>Blastocerus dichotomus</i> , deer, frequency, hemoplasma, hemotropic mycoplasma, molecular characterization, <i>Mycoplasma ovis</i> , <i>Ozotocerus bezoarticus</i>
<b>Subject Area</b>	Short communications



## SHORT COMMUNICATION

**RH: Frequency and characterization of *M. ovis* infection in deer from Brazil**

**Full Title: Frequency of infection and molecular characterization of *Mycoplasma ovis* infection in free-ranging deer populations from Brazil**

Ana Laura Grazziotin <sup>1</sup>, D.V.M., José Maurício Barbanti Duarte <sup>2</sup>, D.V.M, Ph.D., Matias Pablo Juan Szabó <sup>3</sup>, D.V.M., Ph.D., Andrea Pires Santos <sup>4</sup>, D.V.M., Ph.D., Ana Marcia Sa Guimarães <sup>4</sup>, D.V.M., MSc., Ahmed Mohamed <sup>4</sup>, D.V.M., Ph.D., Rafael Felipe Vieira da Costa <sup>5</sup>, D.V.M., MSc., Ivan Roque de Barros Filho <sup>1</sup>, D.V.M., Ph.D., Alexander Welker Biondo <sup>1</sup>, D.V.M., Ph.D., Joanne Belle Messick <sup>4</sup>, V.M.D., Ph.D., Dip. ACVP.

<sup>1</sup> Department of Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários, 1450, Curitiba, PR80035-050, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Animal Sciences, School of Veterinary Medicine, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rua Paulo Donato Castellane, s/n, Jaboticabal, SP14884-900, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Anatomic Pathology, School of Veterinary Medicine, Universidade Federal de Uberlândia, Rua Pará, 1720, Uberlândia, MG38400-902, Brazil.

<sup>4</sup> Department of Comparative Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Purdue University, 725 Harrison Street, West Lafayette, IN47907-2027, USA.

<sup>5</sup> Department of Preventive Veterinary Medicine, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR445 Km 380, Londrina, PR86051-990, Brazil.

\* Correspondent author: Dr. Joanne Belle Messick. Mailing address: Department of Comparative Pathobiology, Purdue University School of Veterinary Medicine, VPRB Building, 725 Harrison Street, West Lafayette, IN 47907-2027, USA. Phone: 1-765-471-9532. Email: jmessic@purdue.edu

**ABSTRACT:** *Mycoplasma ovis* is a hemoplasma that may cause anemia and mortality in small ruminants and cervids. Our aim was to determine whether *M. ovis* infects various populations of free-ranging deer in Brazil. Buffy coat samples from 64 *Blastocerus dichotomus* from Porto Primavera, 18 *Ozotocerus bezoarticus* from Pantanal, and 21 *O. bezoarticus* from Emas National Park were tested. Using a *M. ovis*-PCR protocol on extracted DNA, 46/64 (71.9%) deer from Porto Primavera, 10/18 (55.6%) from Pantanal,

and 4/21 (19%) from Emas National Park were positive, giving an overall frequency of 58.3% for hemoplasma infection in these wild deer. Sequencing and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene revealed 3 genetically distinct hemoplasma species in South American deer, including *M. ovis*, ‘*Candidatus Mycoplasma erythrocervae*’ and, ‘*Candidatus Mycoplasma dichotomae*’. Phylogenetic analysis of the 23S rRNA gene from selected isolates confirmed these relationships.

Key words: *Blastocerus dichotomus*, deer, hemoplasma prevalence, hemotropic mycoplasma, molecular characterization, *Mycoplasma ovis*, *Ozotocerus bezoarticus*.

*Mycoplasma ovis* is a hemotropic mycoplasma (hemoplasma) that attaches to the red blood cells of its host species, which may include sheep, goat and deer. Recently, *M. ovis* was detected using molecular techniques in herds of reindeer (*Rangifer tarandus*) and white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in North America (Stoffregen et al., 2006; Boes et al., unpublished) and in captive marsh deer (*Blastocerus dichotomus*), red brocket deer (*Mazama americana*) and Brazilian dwarf brocket deer (*Mazama nana*) in South America (Grazziotin et al., unpublished). Infected cervids may develop an acute, life threatening infection or chronic course of disease, as described in sheep. Acute disease is characterized by mild to severe, macro or microcytic nonregenerative anemia, overwhelming inflammation, inappetence, and edema. More commonly, infected deer have no clinical signs of disease, no hematologic alteration and no organisms are seen by light microscopic examination of stained blood smears (Stoffregen et al., 2006; Boes et al.; Grazziotin et al.). Thus, cervids may be subclinical, chronic carriers of hemoplasmas.

The presence of two additional hemoplasmas species in deer was recently reported. ‘*Candidatus Mycoplasma erythrocervae*’ and ‘*Candidatus Mycoplasma dichotomae*’ were identified in free-ranging *Cervus nippon* (sika deer) from Japan (Watanabe et al., in press) and captive *Blastocerus dichotomus* from Brazil (Grazziotin et al., unpublished), respectively. Their distinction as a new species was based on sequence identities of their 16S rRNA gene, RNase P gene (Watanabe et al., in press) and 23S rRNA gene (Grazziotin et al., unpublished). The presence of these hemoplasma species as well their pathogenicity in other deer populations are unknown.

Brazil has eight deer species that occupy diverse natural environments in South America (Duarte and Gonzalez, 2010, Merino and Rossi, 2010). However, agriculture,

livestock farms activities, introduction of diseases by domestic animals, constructions of hydroelectric power plants and habitat fragmentation have resulted in declines of deer populations. Two species of deer in Brazil, *Blastocerus dichotomus* and *Ozotocerus bezoarticus* (pampas deer), are considered threatened with decreasing population numbers reported by the International Union for Conservation of Nature (IUCN, 2010). Their habitat overlaps geographically with livestock herds and those of several ticks that may transmit infectious diseases. However, there is no information about the susceptibility of these free-ranging deer species to *M. ovis* or other infectious organisms. The aim of this study was to 1) determine the frequency of *M. ovis* infection in 2 endangered deer species from 3 geographically distinct free-ranging populations and 2) perform molecular characterization and phylogenetic analysis of hemoplasma isolates.

Buffy coat samples (Duarte et al., 1999) of 103 Brazilian deer were provided by the Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) of Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, SP, Brazil. Sixty-four samples were from *B. dichotomus* captured since 1998 in the Parana river basin at Porto-Primavera Hydroelectric Dam areas (22°25'77"S; 52°58'84"W, Sao Paulo, Brazil) as previously described (Szabo et al., 2005; Duarte, 2008) (Fig. 1). The area comprises flat swamps and partially flooded dense forests. Contact between domestic animals and deer was observed (Szabo et al., 2007) as well as presence of ticks on deer (Labruna et al., 2002). Eighteen samples were from *O. bezoarticus* captured since 1995 in farm areas in Pantanal region as described (Tiemann et al., 2005). Pantanal (19°S; 56°W, Mato Grosso do Sul, Brazil) is the largest wetland in the world. The vegetation comprises marsh, seasonally flooded grasslands and forests where abundant fauna cohabits with domestic animals including cattle, ovine and horses. This region has the largest ovine herd in the State with 18,396 head of sheep (Oliveira et al., 2007). Tick infestation on deer has been reported in this region (Bechara et al., 2000). Twenty-one samples were from *O. bezoarticus* captured since 1995 at Emas National Park as described (Tiemann et al., 2005). Emas National Park (18°15'50"S; 52°53'33"W, Goiás, Brazil) is the largest savanna area in Brazil and preserved cerrado in the world. Soybean farmlands surround the park and there is no reported contact between wild and domestic animals. Further there are no reports regarding ticks on deer in this region.

Hematologic data, including total plasma protein (TPP) and/or packed cell volume (PCV) for 57 of the *B. dichotomus* were provided by UNESP. Methods for hematologic analyses were previously described by Szabo et al. (2005). TPP and PCV reference values for *B. dichotomus* were based on this work.

DNA was extracted from 400  $\mu$ L of buffy coat samples using the Quick-gDNA<sup>TM</sup> MiniPrep Kit according to the manufacturer's instructions (Zymo Research Corp., Orange, CA, USA). A PCR protocol to kappa-casein gene specific for ruminants was performed in all samples to verify the presence of amplifiable DNA (Otaviano, 2006) (Table 1). *M. ovis*-PCR assay was performed for *M. ovis* detection as previously described (Neimark et al., 2004). A positive control for *M. ovis* from a naturally infected white-tailed deer was used in all reactions while water was used as negative control.

For sequencing, a conventional PCR was used to amplify the nearly entire (1,370 bp) 16S rRNA gene and the 23S rRNA gene (1,345 bp) of mycoplasmas as previously described (Grazziotin et al., unpublished). The amplified products from all reactions were separated by 1.5% gel electrophoresis, stained with ethidium bromide and photographed under UV light. The 16S and 23S rRNA products were purified from the gel (Zymoclean<sup>TM</sup> Gel DNA Recovery Kit, Zymo Research Corp.) and sequenced in both directions at the Purdue Genomics Core Facility, West Lafayette, IN.

The hemoplasma 16S and 23S rRNA gene sequences obtained were aligned and compared to other mycoplasma sequences available in GenBank databases using CLUSTAL W software (Thompson et al., 1994) in Mega 4.1. software (Tamura et al., 2007). Neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) trees were constructed from a distance matrix employing Kimura 2-parameter model (Kimura, 1980). The dataset was resampled 1,000 times to generate bootstrap values. The sequences were submitted to GenBank databases and the accession numbers are (a) for 16S rRNA gene sequences: HQ634377 - HQ634380; (b) for 23S rRNA gene sequences: HQ634381 - HQ634383.

TPP and PCV values were analyzed using standard statistical software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Statistical Univariate analysis for association between mycoplasma infection and associated factors (TPP and PCV) was conducted using Chi-square or Fisher's exact tests. Results were considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

All the 103 samples were successfully amplified by kappa-casein protocol. Using a *M. ovis* PCR assay, 60/103 (58.2%) examined animals were positive. Among them, 46/64 (71.8%) positive samples were from *B. dichotomus* captured in Porto Primavera, 10/18 (55.5%) positive *O. bezoarticus* were from Pantanal, and 4/21 (19%) were from *O. bezoarticus* captured in Emas National Park. Eighteen isolates (30% of the positive samples) were selected for sequencing of almost the entire 16S rRNA gene of *M. ovis*; 9/46 (19.5%) of the isolates were from Porto Primavera, 5/10 (50%) were from Pantanal and 4/4 (100%) from Emas National Park. The greatest percentage of sequenced samples was performed on deer from Pantanal and Emas National Park due to smaller sample sizes in these areas.

Among 18 isolates, 12 sequences (isolate 1) had 98.9-99% identity to *M. ovis* of sheep (AF338268) and 99-99.5% identity to *M. ovis*-like of fawn (FJ824847). In contrast, six sequences were only 95.7-96.5% identical to *M. ovis* and 95.1-96.4% identical to *M. ovis* of fawn. Five of samples from Porto Primavera (isolate 2) showed 97.4-98% identity to ‘*Candidatus Mycoplasma erythrocervae*’ (AB558898), while 1 sample from Pantanal (isolate 3) was 99.1% identical to ‘*Candidatus Mycoplasma dichotomae*’ (HQ197747) (Table 2). The phylogenetic tree (Fig. 2) confirmed these relationships showing 3 distinct subclusters within the *M. suis* cluster; isolate 1 is most closely related to *M. ovis* of sheep and *M. ovis*-like of fawn; another distinct cluster is shown for isolate 2, which included ‘*Candidatus Mycoplasma erythrocervae*’ and the third for isolate 3 branching with ‘*Candidatus Mycoplasma dichotomae*’.

The 23S rRNA gene of three positive samples, one representative for each of the isolates, were sequenced. Isolate 1 had 98.3% identity to *M. ovis*-like of fawn, while isolates 2 and 3 showed only 93.4% and 91.4% identity. The identities to ‘*Candidatus Mycoplasma dichotomae*’ were 91%, 89.7% and 97.5% for isolates 1, 2 and 3, respectively. Since there are no 23S rRNA gene sequences available for *M. ovis* and ‘*Candidatus Mycoplasma erythrocervae*’, the phylogenetic comparisons were based on only *M. ovis* of fawn and ‘*Candidatus Mycoplasma dichotomae*’. The phylogenetic tree for the 23S rRNA genes was similar to that previously generated for the 16S rRNA genes. Thus, isolate 1 was related to *M. ovis* of fawn, while isolate 2 branched away from *M. ovis*, and isolate 3 was in a distinct subcluster, more closely related to ‘*Candidatus Mycoplasma dichotomae*’ (Fig. 3).

160 Among the hemoplasma positive animals with TPP results, only 2/37 had values  
161 outside the established reference range for deer ( $P = 1.000$ ). Similarly, only 4/42 positive  
162 animals had abnormal PCV values ( $P = 0.562$ ). It was concluded the neither parameter  
163 was associated with hemoplasma infection in these deer.

164 Our data suggests the possibility of a distinct spatial distribution of *M. ovis* and other  
165 hemoplasma infections among free-ranging deer populations in Americas. Both swamp  
166 areas located at Porto Primavera Dam and Pantanal region had a higher frequency of  
167 hemoplasma infection when compared to the dry area of Emas National Park. This high  
168 prevalence was found in the two regions where presence of ticks on deer and their contact  
169 to domestic animals were previously reported. Possibly, these characteristics contribute to  
170 hemoplasma transmission in those areas.

171 Comparative analysis of 16S and 23S rRNA gene sequences revealed the presence of  
172 three genetically distinct hemoplasmas among deer populations in Brazil. Isolate 1 was  
173 found most commonly in this study (12/18) and was nearly identical to the ovine  
174 hemoplasma found in sheep from Germany and in other deer species from USA.  
175 Furthermore, we detected two other isolates; 5/18 sequenced samples (isolate 2) were  
176 more closely related to '*Candidatus Mycoplasma erythrocervae*', whereas 1/18 (isolate 3)  
177 showed greater sequence identity to '*Candidatus Mycoplasma dichotomae*'. Isolates 2  
178 and 3 showed greater than 97% sequence identity to '*Candidatus Mycoplasma*  
179 *erythrocervae*' and '*Candidatus Mycoplasma dichotomae*', respectively. These data  
180 suggest that isolates 1, 2 and 3 are different hemoplasma species.

181 In conclusion, hemoplasma infections are common in free-ranging deer populations.  
182 It is possible that warm, humid conditions are associated with a higher frequency of  
183 infection in certain deer populations and may be related to the presence of ticks and  
184 proximity to sheep. At least 3 genetically distinct species of hemoplasma were found  
185 among deer in these regions. It is important to recognize that the primer set used for  
186 detection of *M. ovis* in this study and other studies may not be species-specific. Thus, it  
187 may amplify other, closely related but distinct hemoplasma species infecting deer.  
188 Further studies are needed to investigate the pathogenic potential of these hemoplasma  
189 species in deer.

## LITERATURE CITED

- BECHARA, G. H., M. P. J. SZABO, J. M. B. DUARTE, E. R. MATUSHIMA, M. CAMPOS PEREIRA, Y. RECHA, J. E. KEIRANS, AND L. J. FIELDEN. 2000. Ticks associated with wild animals in the Nhecolandia Pantanal, Brazil. *Annals New York Academy of Sciences*.
- DRANCOURT, M., D. RAOULT. 2005. Sequence-based identification of new bacteria: a proposition for creation of an orphan bacterium repository. *Journal Clinical Microbiology* 43, 4311-4315.
- DUARTE, J.M.B. 2008. A technique for the capture of free-ranging marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 39: 596–599.
- DUARTE, J.M.B., S. GONZALEZ. 2010. Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer. Funep/IUCN, Jaboticabal/Gland. 393p.
- DUARTE, J.M.B., M.F.P.D.T. RAMALHO, V.F.H. de LIMA, AND W. JORGE, 1999. A leukocyte cryopreservation technique for cytogenetic studies. *Genetics and Molecular Biology*, 22:399-400.
- IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 17 November 2010.
- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- MERINO. M. L.; ROSSI, R. V. 2010. Origin, Systematics, and Morphological Radiation. In Duarte, J.M. B. e González S. Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer, FUNEP/IUCN, Jaboticabal/Gland. 393p.
- NEIMARK, H., B. HOFF, AND M. GANTER. 2004. *Mycoplasma ovis* comb. Nov. (formerly *Eperythrozoon ovis*), an eperythrocyclic agent of haemolytic anaemia in sheep and goat. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 365-371.
- OTAVIANO, A. R. 2006. Polimorfismo dos genes das caseínas e sua utilização na detecção de misturas de leite bovino bubalina. Ph.D. Dissertation, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 82 pp. [In Portuguese].
- SAITOU, N., AND M. NEI. 1987. The Neighbor-joining Method: A new method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology Evolution* 4: 406-425.

STOFFREGEN, W.C., D. P. ALT, M. V. PALMER, S. C. OLSEN, W. R. WATERS,  
AND J. A. STASKO. 2006. Identification of haemycoplasma species in anemic reindeer  
(*Rangifer tarandus*). Journal of Wildlife Diseases 42: 249-258.

SZABO, M. P. J., E. R. MATUSHIMA, M. B. CASTRO, D. A. SANTANA, C. PAULA,  
AND J. M. B. DUARTE. 2005. Hematology of free-living Marsh deer (*Blastocerus  
dichotomus*) from Southeast Brazil. Journal of Zoo and Wildlife Medicine 36: 463-469.

TAMURA, K., J. DUDLEY, M. NEI, AND S. KUMAR. 2007. MEGA4: Molecular  
Evolutionary genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology  
Evolution 24: 1596-1599.

THOMPSON, J. D., D. G. HIGGINS, AND T. J. GIBSON. 1994. CLUSTAL W:  
improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence  
weighting, position-specific gap penalties and weigh matrix choice. Nucleic Acids  
Research 22: 4673-4680.

TIEMANN, J. C. H., S. L. P. SOUZA, A. A. R. RODRIGUEZ, J. M. B. DUARTE, AND  
S. M. GENNARI, 2005. Environmental effect on the occurrence of anti-*Neospora  
caninum* antibodies in pampas-deer (*Ozotocerus bezoarticus*). Veterinary Parasitology  
134: 73-76.

## TABLES

Table 1. Primers used for amplification of housekeeping, 16S rRNA and 23S rRNA  
genes.

Table 2. Identities (%) among sequences by distance matrix – Kimura 2 parameters  
model calculated by MEGA 4.

## FIGURES

Figure 1. Spatial location of the three regions sampled in Brazil.

Figure 2. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the relationship  
of the deer hemoplasma isolates (isolates 1, 2 and 3) to the other hemoplasma species  
using a neighbor joining method. *Mycoplasma ovis* (AF338268), *M. ovis*-like clone Deer-  
Fawn (FJ824847), ‘*Candidatus Mycoplasma dichotomae*’ (HQ197747), ‘*Candidatus  
Mycoplasma erythroceruae*’ (AB558898), ‘*Candidatus Mycoplasma haemocervae*’  
(AB558899), *M. ovis* isolate Mo-Hu-1-05.2007 (EU165511), ‘*Candidatus Mycoplasma  
haemovis*’ isolate CMho-Hu-1-05.2007 (EU165512), *M. wenyonii* (AF016546),



‘*Candidatus M. erythrodidelphis*’ (AF178676), ‘*Candidatus M. haemolamae*’ (AF306346), *M. suis* (AF029394), ‘*Candidatus M. haemtoparvum*’ (AY383241), ‘*Candidatus M. haemominutum*’ (U88564), ‘*Candidatus M. kahanei*’ (AF338269), *M. haemocanis* (AF197337), *M. haemofelis* (FJ824847), *M. haemomuris* (U95297), *M. coccoides* (AY831867), ‘*Candidatus M. turicensis*’ (M29061) are shown. *M. pneumoniae* (M29061) was used as outgroup. Bootstrap percentage values are given at the nodes of the tree.

Figure 3. 23S rRNA gene sequence-based phylogenetic tree, indicating relationships of deer isolates (1, 2 and 3) and members of the genus *Mycoplasma* using a neighbor joining method. The 23S rRNA gene IDs retrieved from complete genome database for each sequence are: *M. hyorhinis* (9712697), *M. mycoides* (2744514), *M. pulmonis* (911080), *M. gallisepticum* (8999768), *M. pneumoniae* (876745), *M. penetrans* (1041297), *M. genitalium* (875271), *M. hominis* (8658487), *M. synoviae* (3564321), *M. capricolum* (3828641), *M. conjunctivae* (7989489), *M. hypneumoniae* (3570963), *M. suis* (ADWK01000001), *M. haemofelis* (Santos et al., unpublished. Genome project ID: 50029), *M. ovis*-like clone Deer-Fawn (HQ197752), ‘*Candidatus Mycoplasma dichotomae*’ (HQ197750) and *Mycoplasma* sp. CLS (GU9050061). *Bacillus cereus* was used as outgroup for both trees. Numbers at nodes refer to bootstrap values.